

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

**FARMAKOKINETIKA IVERMEKTINU V TRUSU OVCE
DOMÁCÍ**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Ivan Vokřál, Ph.D.

Hradec Králové 2019

Dominika Sobotová

PREHLÁSENIE

„Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci riadne citované. Táto práca nebola použitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu“.

V Hradci Králové

Dominika Sobotová

POĎAKOVANIE

Rada by som poďakovala PharmDr. Ivanovi Vokřálovi, Ph.D. za ochotu, cenné rady a vedenie mojej diplomovej práce. Taktiež by som chcela poďakovať mojej rodine a priateľovi za neustálu podporu počas písania tejto práce.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Študentka: Dominika Sobotová

Školitel': PharmDr. Ivan Vokřál, Ph.D.

Názov diplomovej práce: Farmakokinetika ivermektínu v trusu ovce domáci

Kľúčové slová: ivermektín, farmakokinetika, ovca domáca, anthelmintiká

Nákaza vnútornými parazitmi (endoparazitmi) patrí medzi najčastejšie ochorenia u oviec. Nákaza týmito parazitmi najmä vlasovkou slezovou (*Haemonchus contortus*) spôsobuje nemalé ekonomické škody a významne pôsobí na produktivitu oviec. Pre liečbu sa používajú anthelmintiká, medzi ktoré patrí aj ivermektín. Ivermektín patrí do triedy makrocyclických laktónov a vyznačuje sa širokým spektrom účinku a zároveň nízkou toxicitou. Na druhú stranu predstavuje riziko pre životné prostredie v podobe rezíduí, ktoré sú vylučované trusom u liečených jedincov.

Cieľom tejto štúdie bolo určiť exkrečný profil ivermektínu u oviec, ktorý bol subkutánne podaný v štandardnej dávke 0,2 mg/kg živej hmotnosti. Pre analýzu koncentrácie ivermektínu v truse bola použitá UHPLC/MS/MS metóda. Na základe získaných výsledkov sme stanovili základné farmakokinetické parametre ako čas nutný pre dosiahnutie maximálnej koncentrácie (t_{max}), maximálna koncentrácia (c_{max}), plocha pod krivkou (AUC) a priemerný rezidenčný čas (MRT). Pozorovali sme veľké interindividuálne rozdiely a zároveň charakteristický profil vylučovania, ktorý bol u všetkých oviec podobný.

Ďalším cieľom bolo určiť, či je ivermektín v truse rovnako rozptýlený alebo či sa jeho koncentrácia líši. Analýza koncentrácie ivermektínu vo vonkajšej časti trusu v porovnaní s vnútornou preukázala signifikantne vyššie koncentrácie. Je to pravdepodobne spôsobené vylučovaním ivermektínu na povrch trusu za prispenia P-glykoproteínu pri jeho formovaní.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology and Toxicology

Student: Dominika Sobotová

Tutor: PharmDr. Ivan Vokřál, Ph.D.

Title of diploma thesis: Pharmacokinetics of ivermectin in the sheep feces

Key words: ivermectin, pharmacokinetics, sheep, anthelmintic

Infection with internal parasites (endoparasites) is one of the most common diseases in sheep. Infection with these parasites mainly with the barber's pole worm (*Haemonchus contortus*) causes considerable economic losses and has a significant impact on sheep productivity. Anthelmintics, including ivermectin, are used for treatment. Ivermectin belongs to the class of macrocyclic lactones and is characterised by broad spectrum and low toxicity. On the other hand, it poses a risk to the environment in form of residues that are excreted in feces by treated individuals.

The aim of this study was to determine the excretion profile of ivermectin in sheep subcutaneously administered in a standard dose 0,2 mg/kg of body weight. UHPLC/MS/MS method was used for the analysis of ivermectin fecal concentration. Based on the obtained results we determined basic pharmacokinetic parameters which includes time to achieve maximum concentration (t_{\max}), maximum concentration (c_{\max}), area under the curve (AUC) and mean residence time (MRT). We observed great interindividual differences and also characteristic pattern of excretion which was similar in all sheep.

The next objective was to determine whether ivermectin is equally distributed in the feces or whether its concentration varies. The analysis of ivermectin concentration in the exterior of the feces compared to the interior of the feces showed significantly higher concentrations. It is probably due to the excretion of ivermectin on the feces surface, contributing P-glycoprotein in its formation.

OBSAH

1	ÚVOD.....	9
2	TEORETICKÁ ČASŤ	10
2.1	Ivermektín	10
2.1.1	Chemická štruktúra ivermektínu	10
2.1.2	Mechanizmus účinku ivermektínu	11
2.1.3	Použitie ivermektínu.....	12
2.1.4	Farmakokinetické vlastnosti.....	13
2.1.5	Medzidruhové rozdiely.....	16
2.1.6	Ďalší vybraní zástupcovia makrocyclických laktónov.....	18
2.1.7	Spôsoby detekcie ivermektínu.....	20
2.2	Endoparaziti	24
2.2.1	Vlasovka slezová (<i>Haemonchus contortus</i>)	24
2.2.2	Rezistencia.....	25
2.3	Ovca domáca	28
2.3.1	Tráviaci trakt	28
3	Ciele práce	30
4	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	31
4.1	Zvieratá	31
4.2	Reagencia a chemikálie.....	31
4.3	Prístrojové vybavenie.....	31
4.4	Aplikácia ivermektínu a odber vzoriek	32
4.5	Extrakcia ivermektínu zo vzoriek trusu	32
4.6	Extrakcia ivermektínu z vnútornej a vonkajšej časti trusu.....	32
4.7	Príprava vzoriek na UHPLC/MS/MS analýzu	34
4.8	UHPLC/MS/MS analýza.....	34

4.9	Štatistická analýza	35
4.10	Farmakokinetická analýza	35
5	Výsledky	36
5.1	Koncentrácia ivermektínu v truse	36
5.1.1	Jednotlivé zvieratá	36
5.1.2	Celkový priemer	40
5.1.3	Farmakokinetické parametre	40
5.2	Rozdiely v koncentrácii na povrchu a vo vnútri trusu	41
6	Diskusia	45
7	Záver	48
8	Zdroje	49

ZOZNAM SKRATIEK

AUC	plocha pod krivkou
C_{\max}	maximálna plazmatická koncentrácia
CNS	centrálna nervová sústava
DSMO	dimetylsulfoxid
GABA	γ -aminomaslová kyselina
GC/MS	plynová chromatografia v spojení s hmotnostnou spektrometriou
<i>H.contortus</i>	<i>Haemonchus contortus</i> (vlasovka slezová)
HPLC	vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
IR	intraruminálne podanie
MALDI	desorpčná ionizácia vzorku laserom za asistencie matrice
MRT	priemerný rezidenčný čas
MS	hmotnostná spektrometria
MS/MS	tandemová hmotnostná spektrometria
SD	smerodajná odchýlka
SC	subkutánne podanie
$t_{1/2}$	biologický polčas
t_{\max}	čas nutný pre dosiahnutie maximálnej plazmatickej koncentrácie
t_r	retenčný (elučný) čas
UHPLC	ultra-vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
UHPLC/MS/MS	ultra-vysokoúčinná kvapalinová chromatografia v spojení s tandemovou hmotnostnou spektrometriou
V_d	distribučný objem

1 ÚVOD

Nákaza gastrointestinálnymi hlísticami ako je vlasovka slezová (*Haemonchus contortus*) sa stala celosvetovým problémom najmä u malých prežúvavcov ako sú ovce. Nákaza týmto parazitom má vplyv nielen na produktivitu oviec ale spôsobuje aj nemalé ekonomické škody. Iba v Austrálii je táto škoda vyčíslená na 400 miliónov austrálskych dolárov ročne. Používanie vhodne zvolených anthelmintických liečiv je jednou z možností ako tomuto problému čeliť (Saddiqi et al., 2011).

Začiatkom 80. rokov 20. storočia sa začal ako anthelmintické liečivo používať ivermektín. Stal sa výnimočný tým, že pôsobí proti všetkým štádiám väčšiny druhov hlístic a taktiež proti niektorým ektoparazitom (Besier et al., 2016).

Ivermektín patrí do skupiny makrocyclických laktónov podskupiny avermektínov a v dnešnej dobe patrí medzi najpoužívanéjšie antiparazitické liečivá. Druhou skupinou makrocyclických laktónov sú milbemycíny, ktoré taktiež vykazujú anthelmintickú aktivitu. Obe skupiny sú produkované pôdnymi aktinomycétami rodu *Streptomyces* (Danaher et al., 2006).

Farmakokinetické parametre ivermektínu sa značne líšia v závislosti na faktoroch, ktoré by mohli ovplyvňovať jeho plazmatickú koncentráciu čo následne ovplyvňuje aj jeho účinok. Medzi tieto faktory patria druh zvierat'a, celková hmotnosť zvierat'a, telesná a psychická kondícia, spôsob podania, formulácia liečiva a ďalšie. Oboznámenie sa s farmakokinetikou ivermektínu nám pomáha k racionalizácii jeho použitia, podpore účinnosti, predchádzaniu podávania subterapeutických dávok a minimalizovať vznik rezistencie (González Canga et al., 2009).

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Ivermektín

2.1.1 Chemická štruktúra ivermektínu

Molekulárny vzorec: $C_{48}H_{74}O_{14}$

Molekulárna hmotnosť: 875.106 g/mol

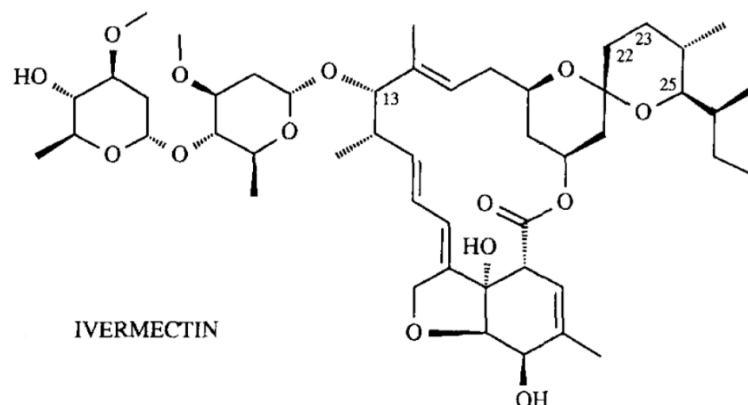
Makrocyclické laktóny sú anthelmintickou skupinou liečiv, ktoré pôsobia na ektoparazity aj endoparazity. Delia sa na avermektíny (napr. abamektín, ivermektín, doramektín) a milbemycíny (napr. milbemycín oxim, moxidectín), pričom obidve skupiny majú spoločný 16-členný makrocyclický laktónový kruh a sú produkované rôznymi druhmi pôdnej aktinomycéty rodu *Streptomyces*. Najväčším rozdielom je neprítomnosť substituenta na C13 u skupiny milbemycínov (Shoop et al., 1995).

Ivermektín patrí do skupiny makrocyclických laktónov a podskupiny avermektínov. Vyznačuje sa aktivitou proti ektoparazitom aj endoparazitom čo sa súhrnne označuje ako endektocidum. Avšak bez účinku na pásomnice a motolice.

Vzniká ako fermentačný produkt pôdnej aktinomycéty *Streptomyces avermiformis*. Obsahuje unikátny farmakofor 16-členný makrocyclický kruh, na ktorý je naviazaný spiroketal, benzofuran a disacharidový substituent na C13. Zároveň je substituent na C13 zodpovedný za aktivitu. Tento farmakofor vytvára špecifickú trojrozmernú štruktúru, ktorá je rozpoznaná konkrétnymi receptormi pre chloridový kanál.

Patrí medzi semisyntetické deriváty, ktoré vznikajú hydrogenáciou dvojitej väzby medzi C22 a C23. Pomocou tejto hydrogenácie ostáva ivermektín v stoličkovej konformácii charakteristickej pre B2 avermektíny vďaka čomu má nižšiu toxicitu. Obsahuje minimálne z 80 % B1a avermektín (22,23-dihydroavermectin-B_{1a}) a z 20 % B1b avermektínu (22,23-dihydroavermectin-B_{1b}), čím si zachováva vynikajúcu antiparazitickú aktivitu, ktorá je pre B1 avermektín typická (Danaher et al., 2006).

Označenie „B“ znamená že na C5 je naviazaná hydroxylová skupina. Číslica „1“ označuje prítomnosť dvojitej väzby medzi C22 a C23. Malé písmeno „a“ vyjadruje sekundárny butyl na C25, malé písmeno „b“ má naviazaný isopropyl na C25. Rozdelenie „a“ a „b“ komponentov nie je potrebné, pretože obidva homológy majú prakticky rovnakú aktivitu (Rew a Vercruysse, 2002).



Obrázok 1. Chemická štruktúra ivermektínu (Steel 1993)

Ivermektín je špinavo biely prášok lipofilnej povahy, veľmi nízkej rozpustnosti vo vode a vysokej rozpustnosti vo všetkých organických rozpúšťadlách (Campbell 1993).

Milbemycíni sú štrukturálne veľmi podobne avermektínom. Obsahujú vo svojej molekule rovnaký farmakofor, ktorý im zabezpečuje účinnosť voči parazitom. Odlišujú sa vo svojich substituentoch na C13, C22-23 a C25. Na C13 neobsahujú disacharidový substituent. Medzi C22-23 majú namiesto dvojitej väzby len jednoduchú väzbu a na C25 majú metylovú alebo etylovú skupinu. Sú produktom fermentácie aktinomycét *Streptomyces hygroscopicus* a *Streptomyces cyanogriseus* (Rew a Vercruysse, 2002).

2.1.2 Mechanizmus účinku ivermektínu

V prvých rokoch skúmania ivermektínu sa predpokladalo, že paralýza parazitov je spôsobená zvýšenou permeabilitou bunkovej membrány pre chloridové ióny, ktorá je zapríčinená pôsobením liečiva na neurotransmiter γ -aminomaslovú kyselinu (GABA). Ako sa neskôr ukázalo nielenže pôsobí ivermektín ako agonista GABA ale tiež potencuje jej presynaptické uvoľnenie a postsynaptické naviazanie. V návaznosti na to sa dokázalo, že ivermektín dokáže vyvolať otvorenie chloridových kanálov aj tam kde sa GABA nenachádza (Campbell 1993).

Ďalšími výskumami sa preukázalo, že väčšiu rolu v mechanizme účinku ivermektínu než GABA receptory majú glutamátovo - chloridové kanály, ktoré sú na neho citlivejšie. Kanály sú exprimované v nervovom systéme parazita a vo svalových bunkách hltanu. Ivermektín ich v podstate ireverzibilne otvára čo vedie k dlhotrvajúcej hyperpolarizácii nervovej alebo svalovej bunky, čím zamedzuje ďalšej funkcii týchto

buniek. Parazit nie je schopný pohybu alebo príjmu potravy z dôvodu blokácie vyššie uvedených buniek, čo zapríčiňuje jeho smrť v dôsledku vyhladovania.

Pre stavovce je ivermektín bezpečný, pretože nedokáže prejsť cez hematoencefalickú bariéru mozgu. Existencia viacerých podtypov glutamátovo – chloridových kanálov, vedú k rôznej citlivosti cieľových organizmov na ivermektín. Táto skutočnosť sa môže odrážať v mechanizme vzniku rezistencie (Wolstenholme a Rogers, 2005).

Významnú rolu hrá aj transportný proteín P-glykoproteín. Nachádza sa v hematoencefalickej bariére mozgu stavovcov, epiteliálnych bunkách gastrointestinálneho traktu a v placentе. Umožňuje transport liečiva z vnútra bunky do vonkajšieho prostredia. Svojím pôsobením zamedzuje toxickým účinkom avermektínov a ich prestupu k citlivým tkanivám. Zapríčiňuje zníženú distribúciu do tkanív, orálnu biodostupnosť a zvyšuje vylučovanie aby sa zabránilo vzniku prípadnej toxicity. V CNS sú avermektíny pomocou P-glykoproteínov naspäť transportované do lumen kapilár čím zabráni nadmernej kumulácii v CNS a prípadnej neurotoxicite v organizme. Prítomnosť P-glykoproteínu v hepatobiliárnom trakte a lumen čreva znižuje biodostupnosť po perorálnom podaní a zároveň zvyšuje citlivosť týchto tkanív na avermektíny.

U zvieracích druhov, u ktorých sa P-glykoproteín na týchto miestach nenachádza dochádza ku zvýšenej absorpcii liečiva po perorálnom podaní čím dosahujú vyššie koncentrácie v plazme ale aj možnosť vzniku prípadných nežiaducich účinkov. Zároveň pri absencii transportných proteínov je znížená eliminácia liečiva žlčou. Nielenže je absorbované vyššie množstvo liečiva ale je aj znížené množstvo ivermektínu, ktoré je aktívne exkretované naspäť do lumen čreva. Prítomnosť P-glykoproteínu v tkanivách je významný protektívny faktor pred nežiaducimi účinkami ivermektínu (Rew a Vercruysse, 2002).

2.1.3 Použitie ivermektínu

Ivermektín sa používa pre liečbu oviec, prasiat a dobytká. Používa sa ako subkutánna injekcia pre liečbu endoparazitárnych aj ectoparazitárnych ochorení, dospelých aj larválnych štádií. U nás sa používa k liečbe gastrointestinálnych obľých červov (napr. *Haemonchus contortus*, *Ostertagia circumcincta*, *Nematodirus filicollis* a ďalších), pľúcniciek, nosných strečkov (všetky larválne štádiá) a svrabu.

U zvierat, ktoré produkujú mlieko pre ľudský konzum sa nesmie podávať v období laktácie a 28 dní pred pôrodom. Ochranná doba u zvierat chovaných na mäso je stanovená na 28 dní u oviec a prasiat, 49 dní u dobytky (ÚSKVBL₁).

Pre injekčné a enterálne podanie sa zväčša používa dávka 0,2-0,3 mg/kg živej hmotnosti. Podanie je buď enterálne hromadné, enterálne individuálne alebo parenterálne subkutánne. Intramuskulárne a intravenózne podanie je kontraindikované. Liečba ivermektínom je obvyčajne dobre znášaná, u niektorých zvierat je pozorovaný dočasný nepokoj, v mieste injekčného podania sa môžu objaviť svrbivé opuchy, ktoré sú ale reverzibilné. Po úhyne veľkého množstva parazitov naraz pri liečbe koní sa môžu vyskytnúť opuchy a svrbenie (Lamka a Ducháček 2014).

Objav ivermektínu a jeho využitia bol veľmi prínosný pre doterajšiu liečbu parazitárnych ochorení u hospodárskych zvierat. Množstvo potrebné pre liečbu bolo až 100 krát menšie než antiparazitárnych liečiv používaných pred objavom makrocyclických laktónov. Často až so 100 % účinnosťou pôsobil proti larválnym a dospelým štádiám hlavných druhov nematód (napr. *Haemonchus contortus*, *Ostertagia circumcincta*, *Trichostrongylus axei* a iné) a larválnym a dospelým štádiám artropód (napr. *Sarcoptes scabiei*, *Haematobia irritans* a iné). Práve vďaka tomu, že ivermektín je vysoko lipofilná molekula tak ostáva v tele ošetrovaných zvierat po relatívne dlhú dobu čím zabraňuje následnej reinfekcii (Rew a Vercruysse, 2002).

2.1.4 Farmakokinetické vlastnosti

Farmakokinetické vlastnosti ivermektínu sú závislé na dávke, s lineárnym zvýšením plochy pod krivkou (AUC) so zvyšujúcou sa dávkou.

Absorpcia

Faktory, na ktorých je závislá systémová absorpcia liečiva sú fyzikálno-chemické vlastnosti liečiva a anatomicko-fyziologické vlastnosti miesta absorpcie. Medzi fyzikálno-chemické vlastnosti patrí veľkosť a tvar molekuly, liposolubilita, rozdeľovací koeficient medzi vodou a nepolárnou fázou, acidobazické vlastnosti liečiva a väzba na bielkovinové štruktúry organizmu (Dostálek et al., 2006).

Parenterálne podanie oddiaľuje absorpciu ivermektínu na rozdiel od orálneho podania, ale vedie k omnoho vyššej biodostupnosti v plazme, dlhšiemu trvaniu aktivity a lepšej účinnosti. Bolo dokázané, že nižšia absorpcia po orálnom podaní je spôsobená

P-glykoproteínom nachádzajúcim sa na epiteli čreva. Výskumy poukázali aj na to, že ak je ivermektín podávaný súčasne s verapamilom dochádza ku vyššej plazmatickej koncentrácii (c_{\max}) a vyššej biodostupnosti čo má za následok zvýšenie antiparazitickej aktivity ivermektínu. Verapamil v tomto prípade pôsobí ako inhibítor P-glykoproteínu.

Ivermektín je vysoko lipofilná molekula a vyznačuje sa svojou extrémne nízkou rozpustnosťou vo vode. Po podaní vo forme subkutánnej injekcie dochádza ku zrážaniu v podkožnom väzive čo zapríčiňuje jeho pomalú absorpciu z miesta podania a predĺženú prítomnosť v krvnom riečisku. U prežúvavých druhov, intraruminálne podanie poskytuje nižšiu systémovú biodostupnosť čo môže byť príčinou nižšej účinnosti voči ektoparazitom a kratšiu dobu pôsobenia voči gastrointestinálnym parazitom. Malé rozdiely vo formulácii môžu viesť k podstatným rozdielom v antiparazitickej aktivite ivermektínu. Tieto rozdiely boli detailnejšie skúmané v prípade dobytky.

Po orálnom aj subkutánnom podaní je ivermektín systémovo absorbovaný, avšak po subkutánnnej aplikácii je absorbovaný vo väčšom rozsahu. Plazmatický profil absorbovaného liečiva závisí od živočíšneho druhu a spôsobu podania. Pri subkutánnom podaní ak je liečivo dávané v nevodnom roztoku dochádza k predĺženiu jeho biologického polčasu ($t_{1/2}$). Absorpciu by bolo možné zrýchliť ak by bolo liečivo podávané vo vodnom médiu (Campbell 1993).

Maximálna plazmatická koncentrácia (c_{\max}) po orálnom podaní je dosahovaná pomalšie u oviec (16h) a dobytky (24h) v porovnaní s koňmi (3h), pravdepodobne vplyvom oneskorenej absorpcie spôsobenej prítomnosťou bachora. Po subkutánnom podaní sú dosahované rôzne plazmatické koncentrácie u dobytky (133 ng/ml), u oviec (31 ng/ml) a u koní (61 ng/ml) (Steel 1993).

Distribúcia

Vďaka tomu, že ivermektín je extrémne lipofilná molekula, vyznačuje sa vysokým distribučným objemom (V_d). Akumuluje sa v tukovom tkanive, ktoré slúži ako rezervoár. Najvyššie koncentrácie sa nachádzajú v pečeni a tukovom tkanive a najnižšie koncentrácie dosahuje v mozgu (González Canga et al., 2009). Má vysokú väzbovosť na albumín a lipoproteíny (98,61 % - sledované v kozej plazme) (Bassissi et al., 2004). Na tieto zistenia by sa malo prihliadať u podvyživených zvierat a ochoreniach, ktoré znižujú množstvo plazmatických bielkovín pretože by to malo za následok zvýšenie voľnej frakcie ivermektínu. Ostáva prítomný v tele po veľmi dlhú

dobu, rádovo v týždňoch nielen kvôli nízkej plazmatickej clearance ale aj kvôli akumulácii v tukovom tkanive (González Canga et al., 2009).

Plazmatická clearance sa zdá byť najvyššia u prasiat a najnižšia u dobytky. Pre ovcu bol distribučný objem (V_d) vypočítaný na 4,6 l/kg, ktorý je dokonca vyšší než u dobytky, u ktorého nadobúda hodnotu 1,9 l/kg. Je to spôsobené práve vyšším obsahom tukového tkaniva u oviec v porovnaní s dobytkom (Lo et al., 1985).

Metabolizmus

Ivermektín podlieha metabolizmu len málo, zväčša je vylúčený v nezmenenej forme najmä trusom a rezíduá liečiva nachádzajúce sa v tkanive sú taktiež hlavne v nezmenenej forme (Campbell 1989).

Hlavnými metabolitmi sú 4-OH-H2B_{1a} ivermektín a 24-OH-H2B_{1b} ivermektín, čo sú metabolity prvej fáze metabolizmu. Okrem týchto dvoch hlavných metabolitov bola zistená aj prítomnosť ďalších metabolitov prvej, ale i druhej fáze biotransformácie. V prvej fáze podlieha ivermektín hydroxylácii a demetylácii alebo kombinácii týchto dvoch procesov čo celkovo vytvára 7 metabolitov. V druhej fáze biotransformácie podlieha glukuronidácii a sulfonácii čo celkovo vytvára 9 metabolitov (Vokřál et al., 2013).

U prasiat sa na rozdiel od oviec a dobytky našli aj 3''-O-demetylované metabolity, ktoré tak nepodliehajú esterifikácii ako metabolity metylované. V dôsledku toho sa nevytvárajú nepolárne esterifikované metabolity, čo znižuje ukladanie ivermektínu v tukovom tkanive (Danaher et al., 2006).

Eliminácia a exkrécia

Hlavnou cestou eliminácie je trus u všetkých druhov bez ohľadu na spôsob podania. Fekálna exkrécia tvorí až 90 % podanej dávky pričom exkrécia močom je < 2 %. Z tohto môžeme usúdiť že žlč je hlavnou exkretčnou cestou. Prítomnosť P-glykoproteínu v biliárnych kanálikoch a v čreve prispieva ku exkrécii ivermektínu trusom. Jeho prítomnosť v čreve ovplyvňuje najmä jeho absorpciu po orálnom podaní čo má za následok jeho zvýšenú exkréciu. Avšak P-glykoproteín nevyužíva ako substrát len ivermektín ale aj ďalšie xenobiotiká, ktoré môžu ovplyvňovať jeho farmakokinetiku. Napríklad verapamil (kompetitívny inhibítor P-glykoproteínu) podávaný súčasne s ivermektínom ovplyvňuje jeho farmakokinetiku tým, že znižuje jeho vylučovanie do

žlči a tým zároveň znižuje aj jeho clearance. Vďaka svojej lipofilite sa exkretuje aj do materského mlieka. Samozrejme exkrécia je ovplyvnená aj spôsobom podania.

Eliminácia u podvyživených zvierat je dlhšia na rozdiel od normálne živých jedincov. Sú zreteľné rozdiely v eliminačnom čase aj v clearance. Pravdepodobne diétne opatrenia znižujú tok žlče a tým aj následnú biliárnu exkréciu ivermektínu (González Canga et al., 2009; Molento et al., 2004).

Po intravenóznom podaní dosahuje ivermektín eliminačného polčasu 35-62 hodín na rozdiel od subkutánneho podania, kde tento čas dosahoval hodnôt 114-216 hodín (Rew a Vercruysse, 2002).

2.1.5 Medzidruhové rozdiely

Bolo dokázané, že spôsob podania, formulácia a medzidruhové rozdiely majú vplyv na farmakokinetické vlastnosti ivermektínu. Biologický polčas ($t_{1/2}$) stúpa v poradí: prasa (0,5 dňa) < pes (1,8 dňa) < dobytok = ovca (2,8 dňa) (Lo et al., 1985).

Plazmatická clearance je rozdielna u monogastrických a polygastrických druhov zvierat. U monogastrických zvierat (napr. prasa, kôň) je vyššia kvôli tomu, že nedochádza k degradácii vo viacerých žalúdkoch ako je tomu u polygastrických druhov. Ivermektín sa v dnešnej dobe používa u viacerých zvieracích druhov. Hlavne u dobytka, oviec, prasiat, koní, kôz a psov (González Canga et al., 2009).

Kôň na rozdiel od ovce patrí medzi monogastrické zvieratá čo znamená, že v ich tráviacom trakte sa nenachádza bachor, ktorý by spôsoboval oneskorenú absorpciu liečiva po orálnom podaní. U koní aj u oviec bolo rýchlejšie dosahovaných maximálnych plazmatických koncentrácií po orálnom než po subkutánnom podaní. Ovce túto koncentráciu dosahovali pomalšie (8-24h) než kone (2-4h) pravdepodobne z dôvodu prítomnosti bachora. Plocha pod krivkou (AUC) po orálnom podaní u koní (4822 ng.h/ml) dosahovala takmer 2,5 krát väčších hodnôt v porovnaní s ovcou (2039 ng.h/ml). V prípade subkutánneho podania kone dosahovali 2 krát vyšších maximálnych plazmatických koncentrácií a AUC. Čas pre dosiahnutie maximálnej plazmatickej koncentrácie (t_{max}) bol po orálnom podaní dlhší u oviec zatiaľ čo po subkutánnom podaní bol dlhší u koní.

Podľa výskumu je dostupnosť po intraruminálnom podaní u oviec iba 25 % na rozdiel od 100 % biodostupnosti po podaní do slezu. Toto zistenie dokazuje veľkú biodegradáciu v bachore. Avšak po subkutánnom podaní u koní sa vyskytli lokálne iritácie spomaľujúce absorpciu a výrazné opuchy, ktoré by mohli spôsobovať

spomalenú absorpciu. Hlavne kvôli týmto lokálnym podráždeniam nie je ivermektín vhodný pre systémové podanie u koní (Marriner et al., 1987).

U dobytky je najviac preštudovaná subkutánna cesta podania. Je sprevádzaná vysokou mierou variability, kvôli rozdielom v druhu, telesnej kondícii, množstvom vzoriek, spôsobom spracovania, absorpciou v mieste podania. Aj napriek tejto variabilite bolo dokázané, že dávky podávané subkutánne sú účinne voči ektoparazitom aj endoparazitom (González Canga et al., 2009).

Po intraruminálnom podaní bola dosiahnutá nižšia plazmatická koncentrácia než po subkutánnom podaní ($IR=29,2$ ng/ml, $SC=133,2$ ng/ml). Najvyššie koncentrácie po podaní boli dosahované v pečeni a tukovom tkanive o niečo nižšie ale stále vysoké v ľadvinách a svalovom tkanive. Rozdiel v metabolizme ivermektínu bol minimálny, rovnako ako v iných druhoch (Chiu et al., 1990).

U oviec bola dokázaná nižšia plazmatická koncentrácia než u dobytky. Po subkutánnom podaní dosahuje biodostupnosť značnej variability od 22 % do 98,2 %. Ako aj u iných druhov je plazmatická koncentrácia po orálnom podaní nižšia než po subkutánnom a zároveň aj doba trvania je kratšia. Maximálna koncentrácia (c_{max}) a AUC bola vyššia u jahniat než u bahníc, čo bolo pravdepodobne spôsobené rozdielnosťami v telesnej kompozícii hlavne v obsahu tuku. Na rozdiel od dobytky a psov je distribúcia rýchlejšia a širšia vďaka omnoho väčšej zásobe tukového tkaniva, ktorá sa chová ako depozit. Kvôli masívnejšej tukovej vrstve dochádza u oviec aj ku väčšej stálosti v plazme v nižších koncentráciách, pravdepodobne kvôli tomu, že tukové tkanivo nie je tak zásobované krvou. Značný first - pass efekt nebol evidentný, biodostupnosť po podaní do slezu bola 100 %. Po intraruminálnom podaní boli dosiahnuté podobné výsledky ako u dobytky tj. biodostupnosť bola 25 %. Po 2 hodinách od intraruminálneho podania ivermektínu bolo 50 % liečiva degradovaných, čo sa pripisuje vysokej väzbovosti na pevné látky a povrchy tráveniny. Biologický polčas je u ovce ($t_{1/2}=2,7$ dňa, $c_{max}=31$ ng/ml) podobný ako u dobytky ($t_{1/2}=2,8$ dňa, $c_{max}=133$ ng/ml) i keď nižšie plazmatické koncentrácie sú pripisované skôr vyššiemu distribučnému objemu než rýchlejšej eliminácii. Prestup do mlieka je nižší než u dobytky ale sú podobné koncentráciám v plazme. Avšak ostáva stabilný aj po tepelnom spracovaní a preto ním nesmú byť liečené jedince, ktoré produkujú mlieko a mäso pre ľudský konzum (González Canga et al., 2009).

Hodnoty maximálnej plazmatickej koncentrácie u kôz ($c_{max}=11,7$ ng/ml) boli nižšie než tie ako u oviec ($c_{max}=31$ ng/ml) a dobytky ($c_{max}=133$ ng/ml). Biodostupnosť

po subkutánnom podaní dosahovala až 91,8 %, po topickom podaní bola 61,5 %. Stálosť v plazme bola predĺžená a nasledovaná perkutánnou cestou podania. Ivermektín vykazoval vysokú väzbovosť na lipoproteíny, albumín a alfa-1-glykoproteín. Táto rozsiahla väzbovosť môže ovplyvňovať dopravu ivermektínu do tukového tkaniva a jeho predĺženú prítomnosť v organizme. Po intravenóznom podaní nasledovala pomalá eliminácia. Množstvo liečiva exkretovaného do mlieka bolo ešte nižšie než u ovce a dosahovalo podobných hodnôt po subkutánnom ako aj po topickom podaní (González et al., 2006; Scott et al., 1990; Bassissi et al., 2004).

Prasatá po subkutánnom podaní dosahovali výrazne nižších hodnôt c_{\max} (7,2-8 ng/ml) a AUC (70-80 ng.d/ml) než dobytok. Vyšší distribučný objem a množstvo tukového tkaniva znižujú aj hodnoty plazmatickej koncentrácie. Avšak množstvo tukového tkaniva na farmakokinetické parametre ivermektínu je sporné. Pri výskume, ktorý uskutočnil Craven et al. (2002) na dvoch skupinách prasiat o podobnej telesnej kondícii (51 kg a 60 kg) neboli zistené rozdielne farmakokinetické parametre s ohľadom na ivermektín (Craven et al., 2002). Podobne ako v iných druhoch najvyššie koncentrácie sa nachádzali v pečeni a tukovom tkanive. Po 24 hodinách po subkutánnom podaní boli zistené vysoké koncentrácie v mieste podania, celom gastrointestinálnom trakte, pľúcach, koži a ušnom maze. Na rozdiel od ovce alebo dobytky je u prasiat kratší biologický polčas (35,2 hodín) (Scott a McKellar, 1992) a vyššia clearance (3,64 l/kg/deň – 4,47 l/kg/deň u jedincov s približne rovnakou hmotnosťou 51,0 – 60,0 kg) čo zapríčiňuje kratšiu ochranu voči parazitom (Craven et al., 2002).

U psov sa používa perorálna forma pre prevenciu pred vlasovcom psím (*Dirofilaria immitis*). Absorpcia je podobná ako u koní čo znamená, že je rýchlejšia než u prežúvavcov a prasiat. Ak sú podané žuvacie tablety je dosahovaná vyššia biodostupnosť. Absorbované množstvo podlieha lineárnej kinetike, pretože c_{\max} a AUC stúpajú v závislosti na dávke. Avšak exkrécia je omnoho rýchlejšia než u oviec alebo dobytky (Daurio et al., 1992).

2.1.6 Ďalší vybraní zástupcovia makrocyclických laktónov

Abamektín

Bol vyvinutý ako injekčná forma pre použitie u dobytky. Je to prírodne vyskytujúci sa avermektín a je využívaný ako základný materiál pre produkciu ivermektínu. Synonymom názvu je aj označenie avermektín B1 a od ivermektínu sa líši

iba dvojitou väzbou medzi C22 a C23. V podobe subkutánnej injekcie má potenciál ako anthelmintikum proti väčšine gastrointestinálnych parazitov čím sa spektrom podobá ivermektínu s rozdielom nižšej účinnosti proti ektoparazitom (Rew a Vercruysse, 2002).

Eprinomektín

V roku 1997 bol schválený pre použitie u dobytky, ktoré produkujú mlieko pre ľudskú potrebu. Aj napriek vysokej antiparazitárnej účinnosti ivermektín nemôže byť používaný kvôli prestupu do mlieka práve u týchto zvierat minimálne po dobu 28 dní po podaní liečiva. Z dôvodu tohto problému bol vyvinutý práve eprinomektín pre liečbu laktujúcich zvierat. Z výskumu vyplynulo, že do mlieka prechádza iba 0,1 % eprinomektínu čo je 50 krát menšia hodnota, než ktorú dosahoval ivermektín alebo moxidektín. Používa sa v podobe pour - on roztoku, kde má účinnosť voči hlavným pľúcny a gastrointestinálnym parazitom. Túto účinnosť si zachováva aj v širokej škále klimatických podmienok.

Podobne ako ivermektín je to semisyntetický produkt, odvodený od avekmektínu B1. Aj keď sú odvodené od rovnakej látky ich chemická štruktúra značným spôsobom mení ich správanie po podaní dobytku. Eprinomektín omnoho lepšie prechádza pokožkou a dosahuje tak vyšších koncentrácií v krvi, ale taktiež sa nevylučuje v takom množstve do mliečnej žľazy u cicavcov ako je tomu pri ivermektíne (Rew a Vercruysse, 2002).

Doramektín

Na rozdiel od ivermektínu sa získava biosyntézou mutantného kmeňa *Streptomyces avermilitis*. Vytvára doramektín, ktorý má rozdielny substituent na C25 na rozdiel od ostatných avermektínov. Bol vyvinutý ako endektocidum pre liečbu parazitárnych ochorení hospodárskych zvierat (Rew a Vercruysse, 2002).

Selamektín

Selamektín je semisyntetický derivát doramektínu. Snahou bolo získať makrocyclický laktón, ktorý by mal zachovanú účinnosť proti vlasovcovi psom a blchám v dávkach, ktoré sú bezpečné pre psy a mačky (Rew a Vercruysse, 2002).

Moxidektín

Podobne ako ivermektín pôsobí moxidektín proti ektoparazitom aj endoparazitom. Používa sa najmä pre liečbu mačiek, psov, fretiek. Pôsobí proti blchám, ušným roztočom, srdečným červom, gastrointestinálnym nematózam a ďalším (ÚSKVBL₂). Je to omnoho lipofilnejšia molekula než ivermektín, čo naznačuje, že sa bude viac distribuovať do tukového tkaniva (Xiao et al., 2019).

Vzniká ako fermentačný produkt *Streptomyces cyaneogriseus subsp. noncyanogenus*. Patrí do skupiny milbemycínov a podobne ako ivermektín obsahuje vo svojej molekule 16-členný farmakofoor. Od ivermektínu sa líši iba nepatrnými rozdielmi v substituentoch na C13, C23 a C25 (Rew a Vercruysse, 2002).

2.1.7 Spôsoby detekcie ivermektínu

Z prvých pokusov o detekciu ivermektínu vyplynulo, že plynová chromatografia nie je kvôli komplexnosti molekuly možná. Preto začala byť používaná vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC) s reverznou fázou a UV detekciou ale bohužiaľ táto metóda nemala dostatočnú citlivosť pre detekciu rezíduí v tkanivách. Ivermektín je liečivo, ktoré stačí podávať vo veľmi nízkych dávkach preto bolo nutné vyvinúť metódu, ktorá by bola dostatočne citlivá a schopná detegovať aj zanedbateľné zvyšky liečiva. Preto Tolan et al. (1980) vyvinuli HPLC metódu, ktorá využívala fluorescenčnú detekciu avermektínov v plazme. Fluorescenčný produkt bol vytvorený chemickou reakciou liečiva s anhydridom kyseliny octovej v pyridíne čoho výsledkom bol konjugovaný dehydratačný produkt. Avšak táto metóda sa ukázala byť ako príliš zdĺhavá, pretože príprava fluorescenčného produktu trvala až 24h a výsledky vykazovali značnú variabilitu. Tway et al. (1981) modifikáciou tejto metódy dokázali skrátiť tvorbu fluorescenčného produktu na 45 minút (Tway et al., 1981).

Ako ďalšou nevhodnou metódou pre detekciu sa ukázala byť kombinácia plynovej chromatografie a hmotnostnej spektrometrie (GC/MS). Ivermektín nie je prchavý, zároveň má príliš veľkú molekulu a je tepelne nestály s ohľadom na jeho celkovú štruktúru. Tieto faktory vylučujú GC/MS či už s chemickou derivatizáciou alebo bez nej (Tway et al., 1984).

V nasledujúcich rokoch sa kvapalinová chromatografia spojená s tandemovou hmotnostnou spektrometriou stala jednou z najsľubnejších techník práve vďaka svojej citlivosti, ktorá bola schopná detegovať aj veľmi nízke koncentrácie. Ako ďalšia vhodná metóda sa ukázala byť kombinácia ultra-vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografie

(UHPLC) a tandemovej hmotnostnej spektrometrie (MS/MS). Touto kombináciou sa ešte zvýšila citlivosť analytickej metódy a skrátil sa retenčný čas (Garrido et al., 2010).

2.1.7.1 Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC)

Chromatografia je metóda, ktorá umožňuje oddeľovanie, identifikáciu a čistenie jednotlivých zložiek zmesí. Táto metóda je použiteľná ako z kvantitatívneho tak aj kvalitatívneho hľadiska. Je založená na oddeľovaní skúmaných analytov aplikovaných na pevnú stacionárnu fázu a sú oddeľované pomocou pohyblivej mobilnej fáze. V prípade HPLC je mobilnou fázou kvapalina. Kvapalinová chromatografia sa využíva najmä k analýze tepelne nestabilných a neprechavých vzoriek (Coskun 2016).

V priebehu procesu dochádza k mnohokrát opakovanému vytváraniu rovnovážnych stavov delených látok medzi stacionárnou fázou a mobilnou fázou. Pri kontakte separovaných látok so stacionárnou aj mobilnou fázou dochádza ku interakciám, ktoré sú predpokladom pre separáciu.

Základom pre HPLC analýzu je kolóna, kde dochádza k rozdeleniu zložiek zmesi na jednotlivé zložky. Pre HPLC sa najčastejšie využívajú kolóny o dĺžke 10 – 25 cm, s vnútorným priemerom 3 – 5 mm, vyrobené z nerezovej oceli alebo skla. Najčastejšie sa používajú chemicky viazané stacionárne fáze, kde na hydroxylové skupiny na povrchu silikagelových zrníek sú naviazané vhodné radikály. Najčastejšie sa jedná o uhl'ovodíkové reťazce, ktoré obsahujú 18 (prípadne 8) uhlíkových atómov. Sú to nepolárne chemicky viazané fáze tzv. reverzné fáze (Klimeš et al., 2011).

Pre správnu analýzu je potrebné aby separované zložky poskytovali ostré a symetrické píky. Ak sú píky ostré vyžaduje sa menší rozdiel v maxime píkov. Čím menšie sú separované častice tým sú dosahované ostrejšie píky (Regnier 1983).

Mobilná fáza je pumpovaná z rezervoáru mobilnej fáze cez injektor do kolóny, ktorou preteká až do detektoru. Vzorka je rozpustená v mobilnej fáze, prechádza kolónou kde je separovaná. Detektor zaznamená jednotlivé separované zložky, vhodne upraví signál a pošle ho do počítača. Počítač signál spracuje a umožní výstup na tlačiareň a zároveň riadi chod celého chromatografu.

HPLC analýza môže byť realizovaná pri konštantnom zložení mobilnej fáze v priebehu celej analýzy vtedy sa jedná o izokratickú elúciu. Ak sa v priebehu analýzy mení zloženie mobilnej fáze vtedy sa jedná o gradientovú elúciu (McMaster 2005).

Kvalitatívnou charakteristikou je retenčný (elučný) čas (t_r), čo je čas od nástreku vzorku na kolónu k maximu chromatografického píku. Dôkazom totožnosti liečiva je

potom zhoda retenčných časov chromatografického píku liečiva vo vzorku s retenčným časom štandardu. Kvantitatívnou charakteristikou je plocha prípadne výška chromatografického píku (Klimeš et al., 2011).

Ultra-vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (UHPLC) predstavuje jednu z najmodernejších typov kvapalinovej chromatografie. Priebeh analýzy ostáva zachovaný avšak prebieha za zvýšeného tlaku až 40 MPa a vyššieho. Na rozdiel od HPLC využíva tiež väčšej rýchlosti čo zabezpečuje zvýšenie rozlíšenia, citlivosti a rýchlosti analýzy. Čas potrebný na analýzu znižuje až o 80 % a zároveň šetrí spotrebu mobilnej fáze taktiež až o 80 % v porovnaní s HPLC. Je potrebné využívať iné stacionárne fáze, ktoré sa vyznačujú mechanickou odolnosťou a vysokou separačnou schopnosťou. Avšak selektivita a citlivosť chromatografickej metódy súvisí najmä s typom detektoru (Guillarme a Veuthey, 2012; Swartz 2005; Chen a Kord, 2013).

Bolo zistené, že ivermektín môže byť jednoducho analyzovaný na reverznej fázi s C18 za použitia organických modifikátorov ako metanol, acetonitril alebo ich kombinácia. Percento vody v mobilnej fáze závisí od množstva analyzovaného liečiva a detekčnom systéme. Pridanie pufru do mobilnej fáze väčšinou nie je potrebné avšak môže byť výhodné pre podporenie ionizácie v priebehu hmotnostnej spektrometrie (MS). Častejšie sa využíva gradientová elúcia na separáciu reziduí a taktiež umožní lepšie separovať interferencie, ktoré by mohli mať vplyv na následné stanovenie (Danaher 2006).

2.1.7.2 Hmotnostná spektrometria (MS)

Hmotnostná spektrometria (MS) podobne ako chromatografia je separačná analytická metóda. Je založená na interakcii nabitých častíc s elektrickým alebo magnetickým poľom vo vákuu. Základom hmotnostného spektrometru sú iónový zdroj, analyzátor a detektor častíc.

Iónový zdroj má za úlohu vytvárať ióny v plynnej fáze, ktoré sa prípadne po svojom vzniku fragmentujú. Z analytov, ktoré vstupujú do iónového zdroja spolu s mobilnou fázou z kvapalinovej chromatografie vznikajú kladne alebo záporne nabité ióny molekulárne (M^+ , M^-), aduktové ($[M+H]^+$, $[M-H]^-$, $[M+CH_5]^+$, $[M+NH_4]^+$ a ďalšie) alebo v prípade menej stabilných látok aj fragmenty ionizovanej molekuly (Friedecký a Lemr, 2012).

Iónové zdroje môžeme obecné rozlíšiť na tvrdé a mäkké a môže prebiehať za zníženého alebo atmosférického tlaku. Pri tvrdej ionizácii dochádza ku tvorbe vysokej

vnútornej energie ionizovanej molekuly, čo spôsobuje rozsiahlu fragmentáciu. Nevýhodou je možnosť úplného rozpadu molekulového iónu v zdroji a tým aj strata informácie o molekulovej hmotnosti. Táto metóda je vhodná iba pre ionizáciu v plynnej fáze čo obmedzuje použitie iba na látky prchavé a tepelne stabilné. Medzi tieto metódy patrí napríklad elektrónová ionizácia. Mäkké techniky pri ionizácii využívajú najskôr ionizáciu reakčného plynu a až následne molekuly analytu. Je dodávané menšie množstvo energie a nedochádza tak k rozsiahlej fragmentácii. K mäkkým technikám patrí napríklad elektrosprej alebo MALDI (desorpčná ionizácia vzorku laserom za asistencie matrice) (De Hoffmann a Stroobant, 2007).

Analyzátor slúži na separáciu iónov v prostredí vákua na základe pomeru hmotnosti ku náboju (m/z). Všetky analyzátory využívajú statické alebo dynamické, magnetické alebo elektrické pole prípadne ich kombinácie. Delia sa na viacero skupín. Prvou skupinou sú skenujúce analyzátory, ktoré kontinuálne v čase separujú a zároveň posielajú k detektoru ióny o určitej hodnote m/z . Patrí sem napríklad kvadrupól. Druhou skupinou sú analyzátory, ktoré rozdeľujú jednotlivé ióny na základe rozdielnej doby letu k detektoru tzv. preletové analyzátory. Poslednou skupinou sú analyzátory, ktoré zachytávajú ióny v cele alebo pasci (iónové pasce, iónovo cyklotronová rezonancia či elektrostatická iónová pasca). Iónovo cyklotronová rezonancia a elektrostatická iónová pasca sa využíva ako kombinácia analyzátoru s detektorom (Friedecký a Lemr, 2012).

Ióny po prejdení analyzátorom sú detegované a transformované na vhodný signál pomocou detektoru. Detekcia iónov je vždy založená na ich náboji, hmotnosti alebo rýchlosti. Obecne sa dajú detektory rozdeliť do dvoch skupín. Prvou skupinou sú tie, ktoré zaznamenávajú všetky ióny bez ohľadu na ich veľkosť m/z . Priamo merajú elektrický prúd, ktorý vzniká pri zrážke iónu s dynódou a následne je zosilňovaný pomocou násobičov. Druhou skupinou sú detektory, ktoré sú schopné zaznamenávať ióny aj vo vzťahu k ich veľkosti m/z (De Hoffmann a Stroobant, 2007).

2.2 Endoparaziti

Na základe toho kde sa parazit v hostiteľovi nachádza rozlišujeme endoparazitov a ektoparazitov. Endoparaziti žijú vo vnútri tela hostiteľa (napr. *Haemonchus contortus*, *Ostertagia circumcincta*, *Trichostrongylus axei* a iné) a môžeme ich ďalej rozdeliť na intracelulárne, ktorí prenikajú do vnútra buniek a extracelulárne. Extracelulárne parazity žijú medzi bunkami hostiteľa alebo vo vnútri jeho telových tekutín. Medzi významných endoparazitov u oviec patria hlístovce, ku ktorým sa radí aj vlasovka slezová (*Haemonchus contortus*) (Volf, Horák et al., 2007).

2.2.1 Vlasovka slezová (*Haemonchus contortus*)

Ríša: živočíchy (Animalia)

Kmeň: hlístovce (Nematoda)

Trieda: Secernentea

Rad: Strongylida

Čeľaď: Trichostrongylidae

Rod: *Haemonchus*

Druh: Vlasovka slezová (*Haemonchus contortus*)

Haemonchus contortus (vlasovka slezová) je jedným z hlavných parazitov dobytku, typický hlavne v tropických a subtropických oblastiach. Je charakteristický vysokou plodnosťou a krátkym generačným intervalom, ktorý dovoľuje rýchlu adaptáciu na nové podmienky a rozvoj rezistencie. Tento slezový parazit sa živí krvou svojho hostiteľa čím je schopný spôsobiť anémiu až smrť. Samičky vedú vyprodukovať 5 000 až 15 000 vajícok za deň. Majú 20 denný vývojový cyklus čím spolu s vysokou plodnosťou sú schopné pomocou genetických variácií rýchlo sa adaptovať na klimatické zmeny, hostiteľa a liečbu. Výskum preukázal, že menšie vajíčka sa vyľahnú rýchlejšie zatiaľ čo väčšie vajíčka sú schopné sa vyľahnúť pri nižších teplotách. Existuje viacero fenotypov *H. contortus*, pričom každý má inú veľkosť vajícok a každý z nich potrebuje inú optimálnu teplotu pre rozvoj a vyľiahnutie svojich vajícok. Pre vyľiahnutie je potrebná minimálna teplota 10-11°C, ktorá na jeseň a v zime klesá čím spôsobuje inhibíciu vývoja. Larvy, ktoré ostanú v tomto období na pasienkoch starnú a stávajú sa predisponované voči inhibícii rastu (Emery et al., 2016).

Diagnóza nákazy týmto parazitom spočíva väčšinou v zistení anémie spolu s charakteristickým epidemiologickým obrazom a následným zistením veľkého množstva parazita v sleze infikovaného zvieratá. Ďalšou možnosťou zistenia

prítomnosti parazita je sčítanie vajíčok v truse zvierat'a. Nákaza týmto parazitom je charakteristická anémiou, zníženou toleranciou námahy, subkutánnym opuchom až smrťou. Nakazené zvieratá kvôli strate krvi sú omnoho slabšie, menej sa pohybujú a viacej času travia ležaním než obyčajne. Trusu je často málo a je tuhý, prípadne môže mať tmavú farbu, ktorú zapríčiňuje prítomnosť krvi.

Pre efektívnu liečbu sa musia dodržiavať nefarmakologické i farmakologické postupy. Avšak pri rapidnom zvýšení počtu *H. contortus* vyžaduje jedinec správnu a efektívnu anthelmintickú liečbu v správnom čase. Výber správneho anthelmintika závisí od ekonomických nákladov, vývoji rezistencie a taktiež od toho či je liečba iba preventívna. Existuje viacero druhov anthelmintických liečiv proti tomuto parazitovi, avšak nie vždy sa dá garantovať efektívnosť liečby vzhľadom na výskyt rezistencie. Rezistencia na ivermektín je široko rozšírená v endemických oblastiach. Zároveň zvyšuje aj prevalenciu rezistencie na moxidektín.

Medzi jeden z nefarmakologických opatrení proti nákaze je správa pasienkov. Snahou je minimalizovať príjem infekčných larií z pastvy citlivými jedincami na nákazu a nadmernej kontaminácii pasienkov vajíčkami čo znižuje možný výskyt hemonchózy krátkodobo aj dlhodobo. Ďalším zo spôsobov je dobrý nutričný stav zvierat. Bolo preukázané, že zvieratá v dobrom stave sú schopné viacej odolávať nákaze parazitmi. Hlavné ciele v boji proti *H. contortus* sú odstránenie zaťaženia parazitom predtým než dosiahne patogénnych hladín, predchádzanie príjmu infekčných larií z pastvy a prevencia kontaminácie pastiev vajíčkami parazita (Besier et al., 2016).

Vlasovka slezová je pravdepodobne jediný hlístovec, ktorého dokážeme diagnostikovať bez pomoci laboratórnych techník. Avšak zvykne sa vyskytovať aj v zmiešanej infekcii s inými parazitickými hlístovcami. Taktiež je najčastejšie spomínaná v súvislosti s anthelmintickou rezistenciou vo všetkých krajinách, v ktorých sú chované malé prežúvavce (Waller a Chandrawathani, 2005).

2.2.2 Rezistencia

H. contortus vykazuje veľmi vysokú schopnosť vzniku rezistencie na jednotlivé liečivá. Už po menej ako 10 rokoch sa vyskytli prvé prípady rezistencie. Rezistencia je obecné definovaná ako schopnosť organizmu prežiť podanú dávku liečiva, ktorá by normálne zabila organizmus rovnakého druhu a štádia. U gastrointestinálneho parazita to v praxi znamená, že sa znižuje účinnosť podaného liečiva v porovnaní s účinnosťou, ktorá bola dosahovaná pri predchádzajúcich podaniach. Mechanizmy vzniku rezistencie

sa u jednotlivých skupín liečiv líšia. Znamená to, že jedna skupina anthelmintík si môže zachovávať aktivitu voči parazitovi zatiaľ čo voči inej sa už prejavuje rezistencia. Aby sa zamedzilo výskytu vysokej rezistencie, používajú sa kombinácie anthelmintík. Avšak boli už zaznamenané prípady rezistencie na kombinačnú terapiu v zložení benzimidalozy, imidazotriazoly a makrocyclické laktóny.

H. contortus je najviac študovaný parazitický hlístovec s ohľadom na anthelmintickú rezistenciu. Jedným z dôvodov je jeho schopnosť vytvárať si rezistenciu na všetky hlavné skupiny anthelmintických liečiv. Na jednej strane je ekonomické hľadisko a na druhej, že tento parazit je výborným experimentálnym modelom vzhľadom na svoju biológiu a fyziológiu. Je charakteristický vysokou plodnosťou, relatívne veľkou veľkosťou dospelého jedinca a jednoduchosťou vzniku a udržiavania veľkých infekcií v hostiteľských zvieratách a možnosť jednoduchých metód na skladovanie voľne žijúcej larválnej fáze.

Mechanizmov vzniku rezistencie je niekoľko. Podieľajú sa na ňom efluxné transportéry, zmeny metabolizmu, strata cieľového miesta účinku, zvýšená schopnosť bunky opravovať sa a kompetícia o substrátový receptor (Kotze a Prichard, 2016).

Pri zmene štruktúry cieľa dochádza k tomu, že liečivo nedokáže správne rozpoznať svoj cieľ čím sa stáva neúčinné. Zmena metabolizmu inaktivuje alebo odstraňuje liečivo alebo zabraňuje jeho aktivácii. Zmena v distribúcii liečiva v cieľovom organizme zabraňuje dosiahnutiu miesta účinku liečiva. Liečivá sú často podávané v dávkach, ktoré sú vyššie než minimálna dávka potrebná na zabitie väčšiny helmintov čím by mohla byť produkovaná vysoká frekvencia rezistentných alel predtým než je vôbec zaznamenaná klinická rezistencia (Wolstenholme et al., 2004).

Rolu v rozvoji rezistencie hrá aj vek napadnutého jedinca. Predpokladá sa, že jahňatá sú menej rezistentné voči napadnutiu parazitom než dospelý jedinec. V niektorých štúdiách bolo pozorované, že vek nemá dôležitý vplyv na rezistenciu u niektorých plemien, u ktorých sa imunita vyvíja už vo veľmi skorom veku. Na druhú stranu domestikované jahňatá sú schopnejšie odolávať nákaze po prekonaní puberty. Ukazuje sa to hlavne u jahniat od 6 mesiacu veku. Taktiež bol pozorovaný rozdiel aj v pohlaví. Barani sa ukázali byť viac vnímaví na gastrointestinálnych parazitov než ovce ako v prirodzených tak aj v experimentálnych nákazách. Avšak tento rozdiel nebol zreteľný pred dosiahnutím puberty. Predpokladá sa, že u baranov sa imunita vyvíja postupne od narodenia do dospelosti zatiaľ čo u oviec dochádza ku prudkému nárastu po dosiahnutí puberty. Dôvodom môže byť prítomnosť steroidných hormónov

(androgénov), ktoré majú vplyv aj na imunitu zvierat'a, preto sú na nákazu náchylnejší samci. Vo vývoji rezistencie má okrem genetických faktorov veľký význam aj kvalita výživy. Ovce, ktoré sú v dobrej kondícii s vysokou metabolickou zásobou proteínov majú väčšiu rezistenciu k infekcii (Saddiqi et al., 2011).

Mechanizmy vzniku rezistencie zatiaľ neboli presne definované. Na detekciu rezistencie a účinnosti liečiv sa využívajú metódy ako sčítavanie mŕtvych červov, počítanie redukcie vajíčok alebo *in vitro* testy vývoju nezrelých štádií parazita. Avšak tieto testy nie sú dostatočne citlivé pre monitorovanie vzniku rezistencie pred jej samotným vznikom.

Na vzniku rezistencie sa podieľa aj P-glykoproteín. Vplyvom zmeny v P-glykoproteíne (zmena v štruktúre alebo v transkripcii) parazita dochádza k jeho nadprodukcii a následnému nadmernému vylučovaniu liečiva z organizmu parazita. Vznik rezistencie s ohľadom na P-glykoproteín závisí aj od chemickej štruktúry anthelmintika. *Haemonchus contortus* produkuje viacero subtypov P-glykoproteínu, ktoré sa od seba odlišujú rôznou citlivosťou k liečivám (Xu et al., 1998).

Rezistencia na ivermektín môže byť spôsobená zníženou citlivosťou svalových a nervových buniek, ktoré ovládajú faryngeálnu pumpu. Ivermektín je známy inhibítor faryngeálnej pumpy aj svalových buniek parazita, pričom faryngeálna pumpa je na účinky ivermektínu citlivejšia. Z toho vyplýva, že ako náhle dosiahne ivermektín koncentráciu, ktorá ovplyvňuje svalové bunky tak je ovplyvnená aj faryngeálna pumpa (Gill a Lacey, 1998).

2.3 Ovca domáca

Ríša: živočíchy (Animalia)

Kmeň: strunovce (Chordata)

Trieda: cicavce (Mammalia)

Rad: párnokopytníky (Artiodactyla)

Podrad: prežúvavce (Ruminantia)

Čeľaď: turovité (Bovidae)

Podčeľaď: kozy a ovce (Caprinae)

Rod: ovce (*Ovis*)

Druh: Ovca domáca (*Ovis aries*)

2.3.1 Tráviaci trakt

Tráviaci trakt sa u jednotlivých zvieracích druhov líši v závislosti na potrave, ktorou sa živia. Ovce patria medzi bylinožravce a prežúvavce, ktoré na rozdiel od mäsožravcov majú zložený žalúdok osídlený mikrobiálnou flórou, ktorá napomáha fermentácii ťažko stráviteľných cukrov. Žalúdok ovce je zložený a skladá sa z predžalúdka a pravého žalúdka (abomasum). Predžalúdok sa skladá z troch častí a to z bachora (rumen), čepca (retikulum) a knihy (omasum). Úlohou predžalúdka je zabezpečiť natrávenie krmiva, ktoré je pre neprežúvavcov nestráviteľné. Zložený žalúdok dáva prežúvavcom niekoľko výhod a to schopnosť rozštiepiť celulózu, využiť neproteínové zdroje dusíku, medzi ktoré patria močovina a kyselina močová a schopnosť tvorby komplexu vitamínov B vďaka prítomnej mikroflóre avšak iba pokiaľ je v potrave prítomný kobalt (Denbow a Akers, 2013). Na štiepenie celulózy nemajú prežúvavce vlastné tráviace enzýmy. Predžalúdok, kde prebieha trávenie celulózy a ďalších živín využíva enzýmy, ktoré sú produkované mikróbmi, ktoré osídľujú prostredie predžalúdka (Jelínek a Koudela, 2013).

Na druhú stranu vyskytuje sa aj niekoľko nevýhod a to tvorba veľkého množstva alkalických slín, tvorba prchavých kyselín, ktoré sú uvoľňované do prostredia a značnú časť dňa strávia prežúvaním potravy (Denbow a Akers, 2013).

Predžalúdok

Bachor (rumen) je najväčšou a najvýznamnejšou časťou predžalúdka. Vnútro je vystlané papilami, ktoré značne zväčšujú jeho objem a tým poskytujú priestor pre absorpciu látok (Harfoot 1981). Vnútro bachora je vystlané viacvrstvovým

dlaždicovitým epitelom, ktorý je bez žliaz (Sláma et al., 2015). Dochádza v ňom ku premiešavaniu, ukladaniu, riedeniu, triedeniu a posúvaniu potravy do ďalších častí tráviaceho traktu (Jelínek a Koudela, 2013).

Najmenšou časťou predžalúdka je čepiec. S bachorom je spojený čepcobachorovým ústím a s knihou čepcoknihovým ústím (Sláma et al., 2015).

Posledná časť predžalúdka je kniha (omasum). Hlavnou úlohou je odstraňovanie vody z natráveniny, ktorá postupuje ďalej do pravého žalúdka. Množstvo vody absorbovanej v knihe sa líši. Ďalším procesom, ktorý prebieha v knihe je absorpcia prchavých mastných kyselín (Harfoot 1981).

Pravý žalúdok (abomasum)

Svojou štruktúrou a funkciou sa najviac podobá žalúdku neprežúvavých živočíchov. Žalúdočný obsah dosahuje hodnôt okolo pH 2,0. Nízka hodnota pH zabezpečuje smrť baktérií, smrť a rozpad prvkov, ktorým sa podarí prejsť až do pravého žalúdka. Ďalšou úlohou nízkeho pH je dosiahnuť optimálne podmienky pre aktivitu peptických enzýmov, ktoré sú zodpovedné za trávenie mikrobiálnych proteínov v žalúdku (Harfoot 1981). Úlohou je premiešavanie potravy s žalúdočnými kyselinami a jej prechod do dvanástnika (Jelínek a Koudela, 2013).

Ruminácia

Ruminácia je proces, pri ktorom dochádza ku navráteniu sústa z čepca a bachora naspäť do ústnej dutiny k opätovnému prežutiu. Toto opätovné prežúvanie je veľmi dôležité pretože dochádza ku macerácii rastlín s alkalickými slinami, čo má za následok fyzické poškodenie rastlinných buniek čo napomáha mikrobiálnemu tráveniu v rumen (Harfoot 1981).

Potrava je nedokonale a povrchno spracovaná, prehltnutá a uložená do predžalúdka, kde v prípade ovce pretrváva 15-70 minút. Po období kľudu je opätovne vrátená do ústnej dutiny na dôkladnejšie spracovanie. Ruminácia má niekoľko častí. Prvou je rejekcia (vyvrhnutie sústa do ústnej dutiny), druhou je prežúvanie rejekovaných súst a ich preslinenie a poslednou je prehltutie. Význam majú aj viaceré endogénne a exogénne faktory. Medzi endogénne faktory patrí ustajnenie, kŕmenie a dojenie. K exogénnym faktorom patria mechanické a chemické podnety (Jelínek a Koudela, 2013).

3 Ciele práce

V rámci tejto práce bolo cieľom:

1. Extrahovať vzorky trusu z šiestich barančekov, ktorým bola podaná štandardná dávka ivermektínu.
2. V týchto vzorkách stanoviť koncentráciu ivermektínu a stanoviť základné farmakokinetické parametre.
3. Analyzovať, či sa nejako líši koncentrácia ivermektínu vo vnútri a vonku formovaného trusu.

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 Zvieratá

Experimenty boli vykonávané v súlade so zákonom č. 246/1992 Sb. (Zákon České národní rady na ochranu zvířat proti týrání).

Tab. 1 Informácie o pokusných jedincoch

Číslo ovce	Hmotnosť (kg)	Pohlavie
CZ 69 768 / 053	43,0	M
CZ 69 770 / 053	44,5	M
CZ 69 784 / 053	36,5	M
CZ 69 793 / 053	36,4	M
CZ 69 796 / 053	44,0	M
CZ 69 802 / 053	31,5	M

4.2 Reagencia a chemikálie

Etylacetát – Sigma-Aldrich (Praha, ČR)

Amoniak (25-28% v/v) – Sigma-Aldrich (Praha, ČR)

Doramektín (50 µM) – Sigma-Aldrich (Praha, ČR)

Ivermektín –Sigma-Aldrich (Praha, ČR)

Octan amonný – Sigma-Aldrich (Praha, ČR)

4.3 Prístrojové vybavenie

Váhy – Sartorius M-prove

Automatické pipety – HTL Lab Solutions

Trepačka – Heidolph Multi Reax

Centrifúga – Eppendorf 5810R

Odparka – Eppendorf 5301

Ultrazvuková kúpeľ – Kraitex s.r.o K2

Skúmavky 15 ml – VWR

Mikroskúmavky 1,5 ml – Eppendorf

Kvapalinový chromatograf – Shimadzu Nexera

Hmotnostný spektrometer – Shimadzu 8030

4.4 Aplikácia ivermektínu a odber vzoriek

Ivermektín bol podaný subkutánne v dávke 0,2 mg/kg živej hmotnosti. Vzorky trusu boli odoberané priamo z konečníkovej ampule a skladované pri teplote -20°C do doby extrakcie. Vzorky boli odoberané v intervaloch 0, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 120, 144, 192, 240, 288, 384, 480, 576 a 672 hodín po podaní ivermektínu. Slepé vzorky boli odobraté 2 dni pred podaním ivermektínu. Odbery prebiehali od 21.11. 2016 od 9:00 do 20.12. 2016 9:00.

4.5 Extrakcia ivermektínu zo vzoriek trusu

Z každého vzorku sme navážili 0,5 g trusu, ktorý sme zhomogenizovali s 3 ml redestilovanej vody v trecej miske s tĺčikom. Pridali sme 10 μl vnútorného štandardu doramektínu (50 μM rozpustený v DMSO) a intenzívne sme premiešali. Celý obsah sme preliali do 15 ml skúmavky. Porcelánovú misku sme najskôr prepláchli 1 ml redestilovanej vody, ktorú sme preliali do skúmavky a následne sme misku prepláchli 8 ml etylacetátu, ktorý sme taktiež preliali do rovnakej skúmavky. Pridali sme 130 μl koncentrovaného roztoku amoniaku (25-28% v/v), skúmavku sme poriadne utiahli a nechali sme ju pretrepávať 5 minút na trepačke pri plnom výkone. Nasledovala centrifugácia (4000 RPM, 10 minút). Vrchnú organickú vrstvu sme opatrne prepipetovali po 3 ml do 5 ml mikroskúmavky (ependorfky). Organickú vrstvu sme nechali odpariť na odparke do sucha (program 2, 45°C). Odparovanie etylacetátu bolo nutné opakovať dvakrát.

Opätovne sme do 15 ml skúmavky pridali 8 ml etylacetátu a celý proces sme opakovali pri rovnakých podmienkach. Odparené vzorky sme označili, uzavreli a skladovali v mrazničke pri teplote -20°C až do ďalšieho spracovania.

Slepé vzorky sme kvôli stanoveniu výťažnosti extrakcie doplnili najskôr štandardnými roztokmi ivermektínu a doramektínu obidva v koncentráciách 1, 10 a 50 μM a následné extrahovali podľa postupu popísaného vyššie.

4.6 Extrakcia ivermektínu z vnútornej a vonkajšej časti trusu

Aby sme zistili v akej fáze tvorby trusu sa vylučujú vyššie koncentrácie ivermektínu vybrali sme tri odberové termíny a tri ovce, ktoré dosahovali najvyššie hodnoty. Hneď po vybratí trusu z mrazničky sme oddelili vnútro od povrchovej časti trusu pomocou skalpelu. Bolo nutné pracovať rýchlo, pretože po rozmrazení bolo oddelenie náročnejšie a dochádzalo k zničeniu trusu čo spôsobilo, že bolo nutné vybrať

d'alšiu vzorku. Po oddelení sme obidve časti zvážili a extrahovali pomocou metódy popísanej vyššie. Od každej ovce boli pre vyššiu presnosť merania a porovnanie použité dva vzorky.

Tab. 2 Hmotnosti povrchu a vnútra trusu vybraných oviec zo dňa 23. 11. 2016 21:00
(36 hodín po aplikácii liečiva)

Dátum odberu: 23.11. 2016 21:00	Vzorka č.1 povrch	Vzorka č. 1 vnútro	Vzorka č. 2 povrch	Vzorka č. 2 vnútro
784	0,11 g	0,34 g	0,15 g	0,37 g
796	0,10 g	0,36 g	0,10 g	0,39 g
802	0,07 g	0,35 g	0,08 g	0,41 g

Pre lepšie porovnanie obsahu ivermektínu a presnejšie údaje boli v následných extrakciách použité rovnaké hmotnostné množstvá z povrchovej a vnútornej časti trusu. Extrakcia bola vykonaná podľa rovnakej metódy popísanej vyššie.

Tab. 3 Hmotnosti povrchu a vnútra trusu vybraných oviec zo dňa 23. 11. 2016 21:00
(36 hodín po aplikácii liečiva)

Dátum odberu: 23.11. 2016 21:00	Vzorka č.1 povrch	Vzorka č. 1 vnútro	Vzorka č. 2 povrch	Vzorka č. 2 vnútro
784	0,09 g	0,09 g	0,08 g	0,08 g
796	0,06 g	0,06 g	0,10 g	0,10 g
802	0,10 g	0,10 g	0,12 g	0,12 g

Tab. 4 Hmotnosti povrchu a vnútra trusu vybraných oviec zo dňa 25.11. 2016 21:00
(84 hodín po aplikácii liečiva)

Dátum odberu: 25.11. 2016 21:00	Vzorka č.1 povrch	Vzorka č. 1 vnútro	Vzorka č. 2 povrch	Vzorka č. 2 vnútro
784	0,18 g	0,18 g	0,15 g	0,15 g
796	0,10 g	0,10 g	0,12 g	0,12 g
802	0,10 g	0,10 g	0,12 g	0,12 g

Tab. 5 Hmotnosti povrchu a vnútra trusu vybraných oviec zo dňa 30. 11. 2016 9:00
(192 hodín po aplikácii liečiva)

Dátum odberu: 30.11. 2016 9:00	Vzorka č.1 povrch	Vzorka č. 1 vnútro	Vzorka č. 2 povrch	Vzorka č. 2 vnútro
784	0,10 g	0,10 g	0,08 g	0,08 g
796	0,09 g	0,09 g	0,09 g	0,09 g
802	0,12 g	0,12 g	0,11 g	0,11 g

4.7 Príprava vzoriek na UHPLC/MS/MS analýzu

Ku vzorkám sme pridali 100 μl mobilnej fáze (50% A= acetonitril, 50% B= pufer octanu amónneho, 5mM, pH 6,5), ktoré sme následne vložili do ultrazvukovej kúpele na 40 minút. Potom nasledovala centrifugácia (10 000 RPM, 10 minút) a obsah skúmaviek sme prefiltrovali cez 4 mm 0,22 μm injekčné filtre do sklenených inzerťov.

4.8 UHPLC/MS/MS analýza

Z každého vzorku bol nastreknutý do chromatografického systému 1 μl vzorku a každé meranie bolo opakované 3x. Pre meranie bola použitá modifikovaná UHPLC/MS/MS metóda skôr popísaná Vokřálom et al. (2013). Pre štúdiu bolo použité UHPLC Shimadzu Nexera spojené s hmotnostným spektrometrom (MS) Shimadzu LCMS-8030 typu trojitého kvadrupólu a vybavené chromatografickou kolónou typu C18 (Zorbax Eclipse Plus C18, Rapid Resolution HD 2.1 x150 mm, 1.8 μm , Agilent). Teplota kolóny bola nastavená na 40°C.

Pre separáciu bola použitá lineárna gradientová elúcia. Mobilná fáza pozostávala z acetonitrilu (A) a pufru (octan amonný, 5 mM, pH 6.5) (B). Gradient bol nasledujúci: 0 min – 15% A, 10 min – 95% A, 17 min 95% A. Následne bola kolóna premytá a rekondiciovaná po dobu 20 minút. Prietok bol 300 $\mu\text{l}.\text{min}^{-1}$. Retenčný čas bol 12.65 minút pre doramektín a 14.00 minút pre ivermektín.

Nastavenie MS bolo nasledujúce: elektrosprejová ionizácia 4.5 kV v pozitívnom záznamovom móde, sprejovací plyn (dusík) prietok 2 $\text{l}.\text{min}^{-1}$, sušiaci plyn (dusík) prietok 12 $\text{l}.\text{min}^{-1}$, heat block teplota 400 °C a DL line teplota 250 °C. Argón bol použitý ako kolízny plyn. Všetky optimalizácie boli vykonané pomocou softwaru Lab Solution v.5v60 SP2 software (Shimadzu, Kyoto, Japan). Ivermektín a doramektín boli pozorované hlavne ako amónne adukty $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ o m/z 892.30 (ivermektín) a m/z 916.20 (doramektín). Produktové ióny a kolízna energia boli nasledujúce: Ivermektín: produktové ióny (kolízna energia [eV]): 137.10 (-42), 307.30 (-29), 551.40 (-25); Doramektín produktové ióny (kolízna energia [eV]): 95.10 (-54), 145.00 (-9), 331.20 (-40).

Kalibrácia pre ivermektín bola vykonaná v rozsahu 0.1-20.0 μM . Limit detekcie a kvantifikácie pre ivermektín bol 13 nM respektíve 45 nM.

4.9 Štatistická analýza

Dáta vo výsledkovej časti sú prezentované ako priemery \pm smerodajná odchýlka (SD). Všetky vzorky boli spracované v duplikáte. Štatistická analýza pre stanovenie rozdielov koncentrácií na povrchu a vo vnútri trusu bola vykonaná 2way ANOVA metódou s následným Sidakovým testom. Hodnota významnosti: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. Pre štatistickú analýzu bol použitý software GraphPad Prism 8.

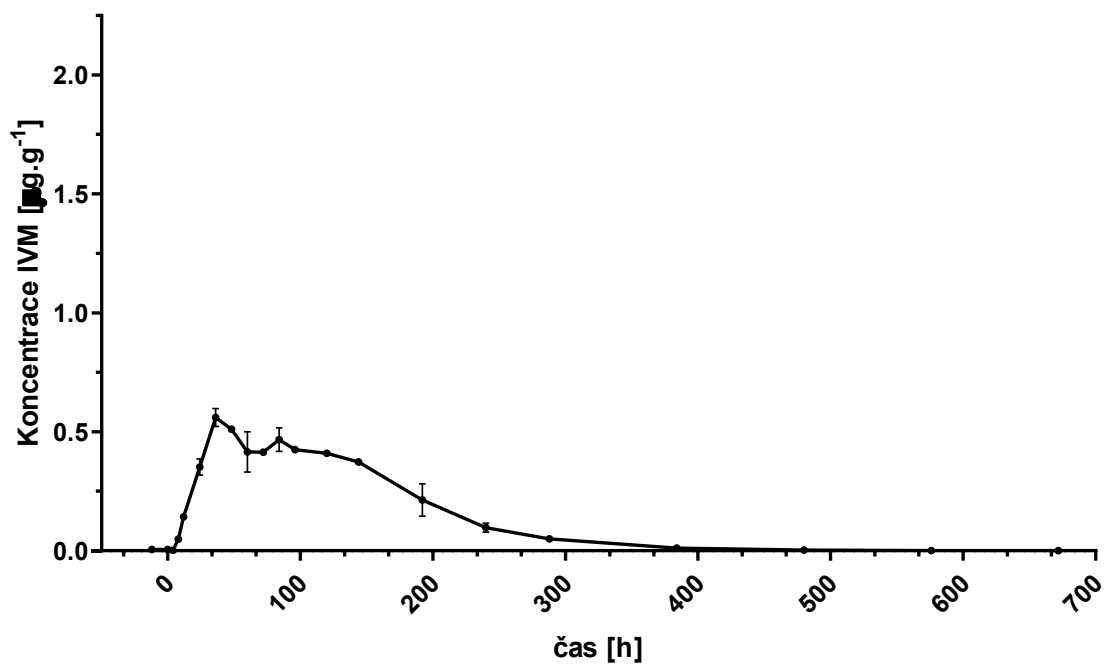
4.10 Farmakokinetická analýza

Dáta boli spracované v programe Microsoft Excel 2016. Farmakokinetická analýza bola vykonaná pomocou programu PKsolver (Zhang et al., 2010) a boli stanovené parametre: čas nutný pre dosiahnutie maximálnej koncentrácie (t_{\max}), maximálna koncentrácia v mokrom truse (c_{\max}), plocha pod krivkou (AUC) a priemerný rezidenčný čas (MRT).

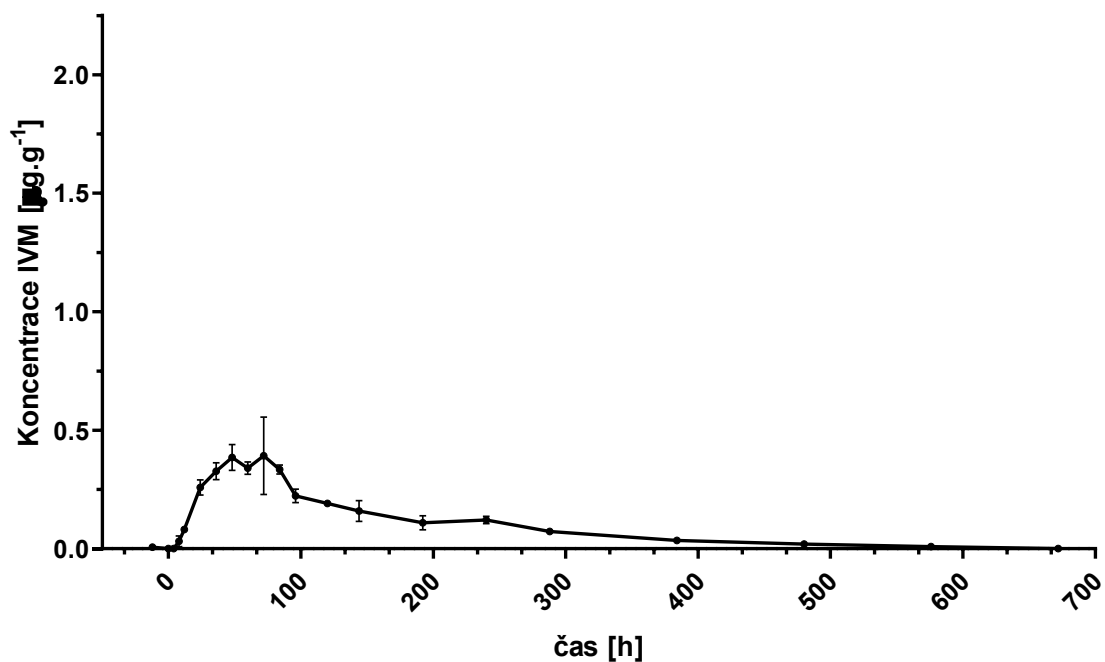
5 Výsledky

5.1 Koncentrácia ivermektínu v truse

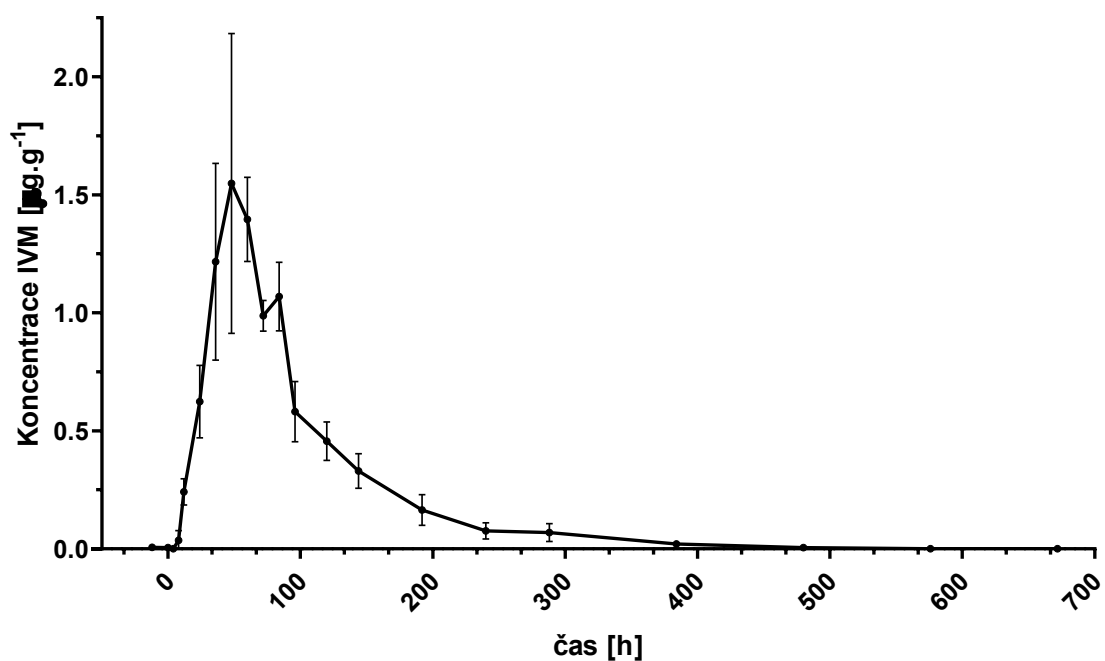
5.1.1 Jednotlivé zvieratá



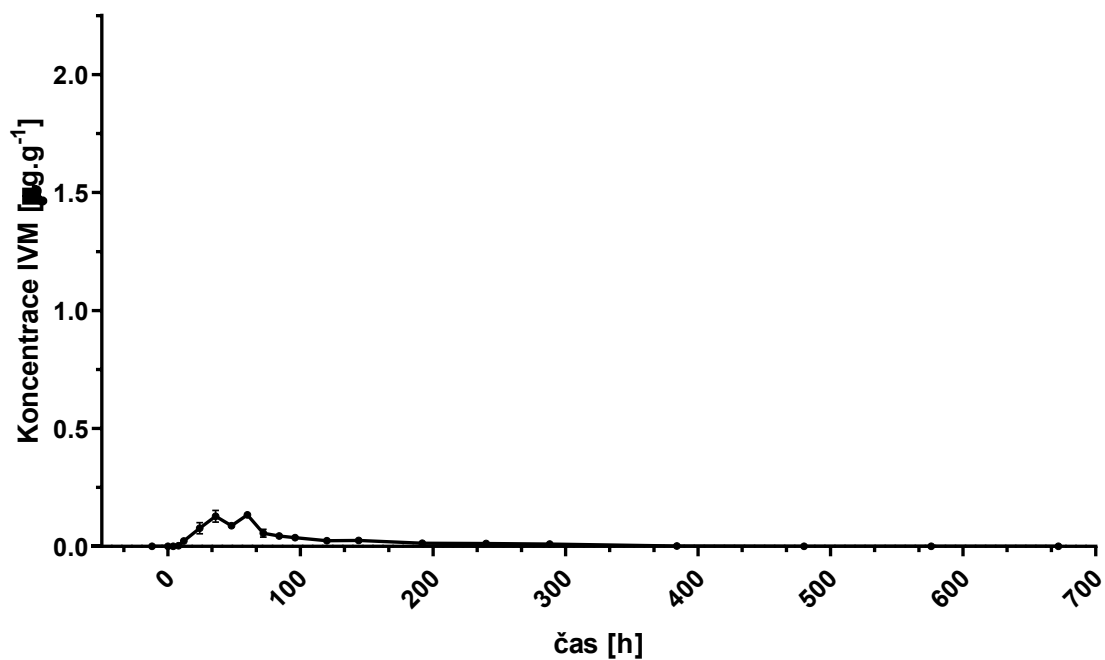
Obrázok 2. Graf závislosti koncentrácie ivermektínu na čase u ovce č. 768. Maximálna koncentrácia dosiahla hodnôt $0,5352819 \mu\text{g.g}^{-1}$ v čase 36h od podania ivermektínu. Výsledky sú vyjadrené ako priemery \pm SD.



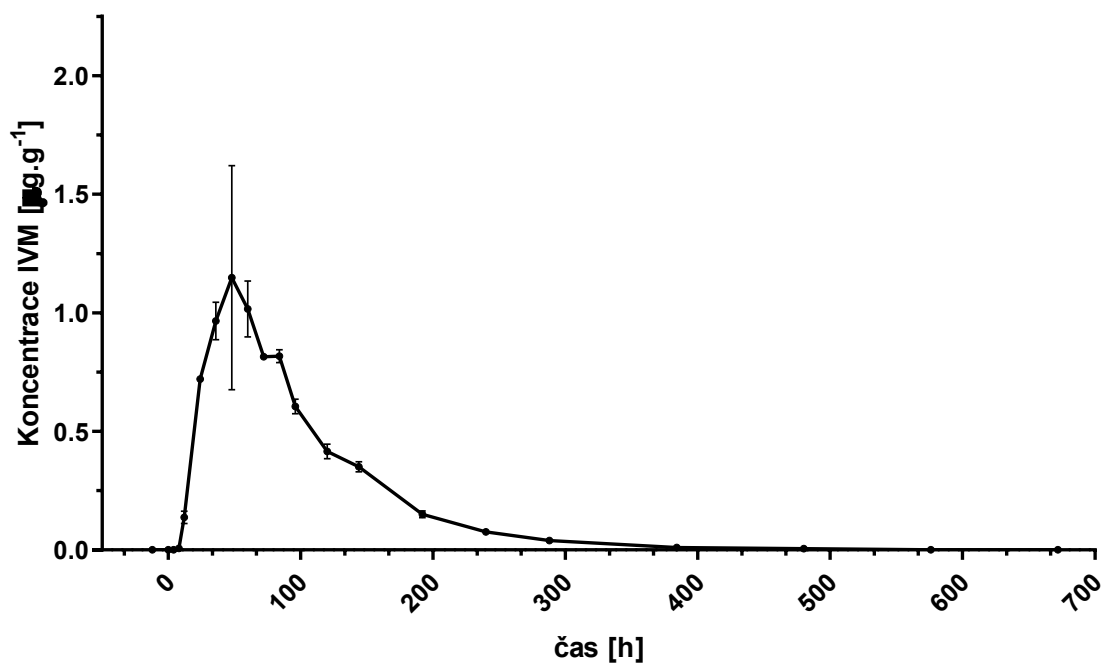
Obrázok 3. Graf závislosti koncentrácie ivermektínu na čase u ovce č. 770. Maximálna koncentrácia dosiahla hodnôt $0,346715 \mu\text{g.g}^{-1}$ v čase 48h od podania ivermektínu. Výsledky sú vyjadrené ako priemery \pm SD.



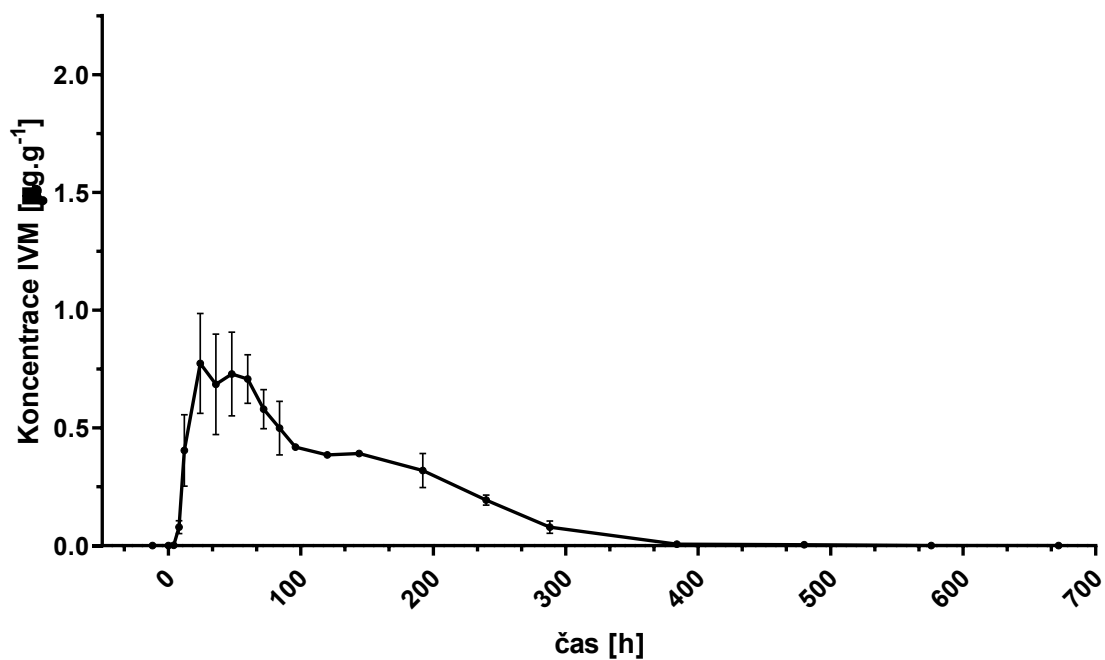
Obrázok 4. Graf závislosti koncentrácie ivermektínu na čase u ovce č. 784. Maximálna koncentrácia dosiahla hodnôt $1,268603 \mu\text{g.g}^{-1}$ v čase 60h od podania ivermektínu. Výsledky sú vyjadrené ako priemery \pm SD.



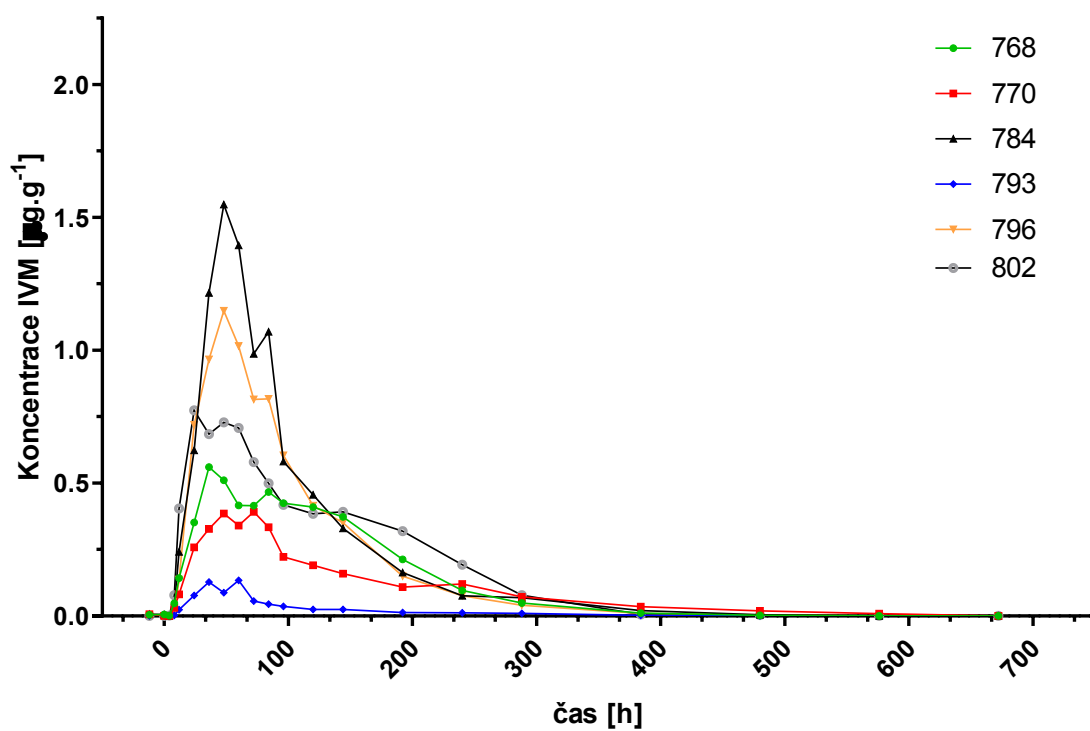
Obrázok 5. Graf závislosti koncentrácie ivermektínu na čase u ovce č. 793. Maximálna koncentrácia dosiahla hodnôt $0,134007 \mu\text{g.g}^{-1}$ v čase 60h od podania ivermektínu. Pre významné odlišnosti z neznámych dôvodov bola zo štúdie vyradená.



Obrázok 6. Graf závislosti koncentrácie ivermektínu na čase u ovce č. 796. Maximálna koncentrácia dosiahla hodnôt $1,021125 \mu\text{g.g}^{-1}$ v čase 36h od podania ivermektínu. Výsledky sú vyjadrené ako priemery \pm SD.

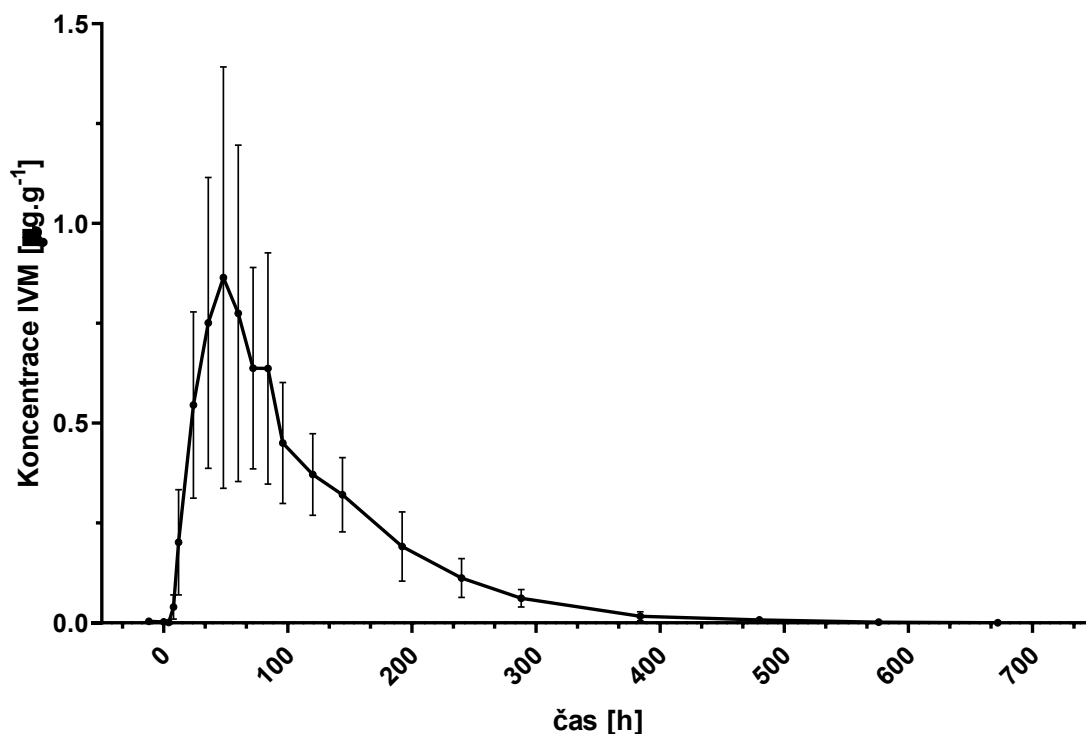


Obrázok 7. Graf závislosti koncentrácie ivermektínu na čase u ovce č. 802. Maximálna koncentrácia dosiahla hodnôt $0,924922 \mu\text{g.g}^{-1}$ v čase 24h od podania ivermektínu. Výsledky sú vyjadrené ako priemery \pm SD.



Obrázok 8. Graf závislosti koncentrácie ivermektínu na čase: porovnanie jednotlivých oviec. Výsledky sú vyjadrené ako priemery, pre ľahkú čitateľnosť bez SD.

5.1.2 Celkový priemer



Obrázok 9. Graf závislosti koncentrácie ivermektínu na čase u všetkých oviec. Ovoc číslo 793 nebola zahrnutá z dôvodu výrazných odlišností od ostatných oviec. Výsledky sú vyjadrené ako priemery \pm SD.

5.1.3 Farmakokinetické parametre

Základné kinetické parametre ivermektínu získané z analýzy trusu po jednorazovom podaní štandardnej dávky ($0,2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, s.c.) vypočítané na základe nameraných dát z piatich oviec. Pre analýzu bol použitý program PkSolver (viz kapitola 4.10).

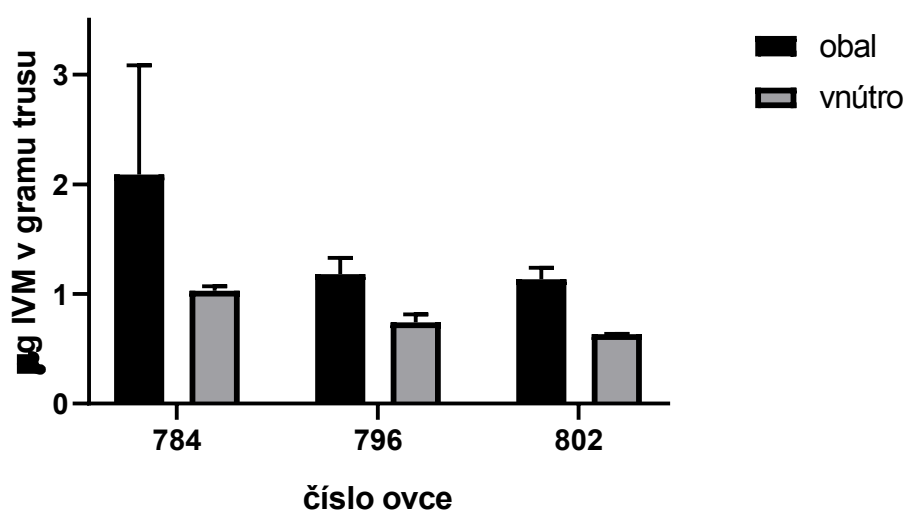
Tab 6. Základné farmakokinetické parametre ivermektínu

Parameter	Jednotka	Hodnota \pm SD
t_{\max}	h	$46,8 \pm 13,63$
c_{\max}	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	$0,93 \pm 0,50$
AUC	$\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{g}^{-1}$	$101,91 \pm 28,44$
MRT	h	$122,26 \pm 25,13$

t_{\max} - čas nutný pre dosiahnutie maximálnej koncentrácie, c_{\max} - maximálna koncentrácia v mokrom truse, AUC - plocha pod krivkou, MRT - priemerný rezidenčný čas, SD - smerodajná odchýlka

5.2 Rozdiely v koncentrácii na povrchu a vo vnútri trusu

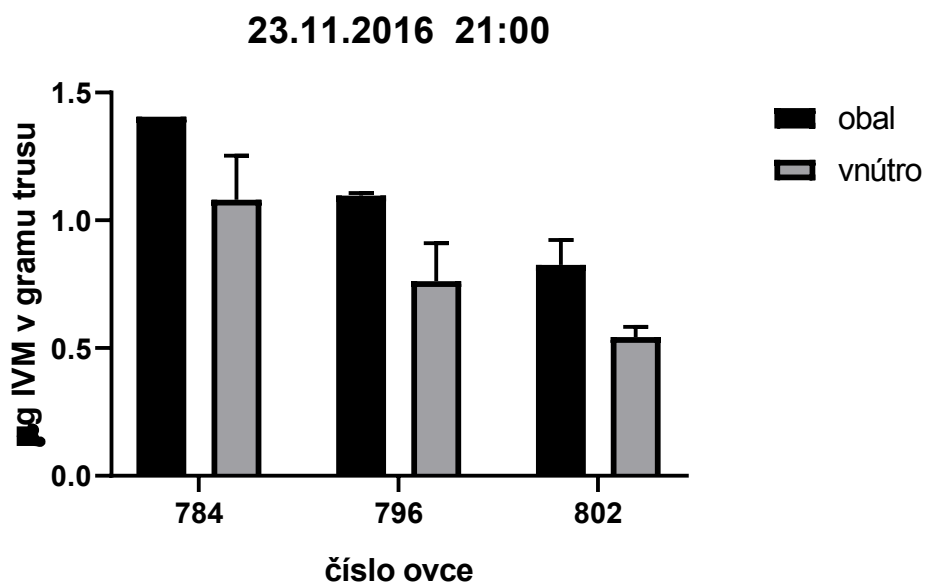
23.11.2016 21:00 - pilotní extrakce



Obrázok 10. Porovnanie koncentrácií obalu a vnútra trusu u vybraných oviec.

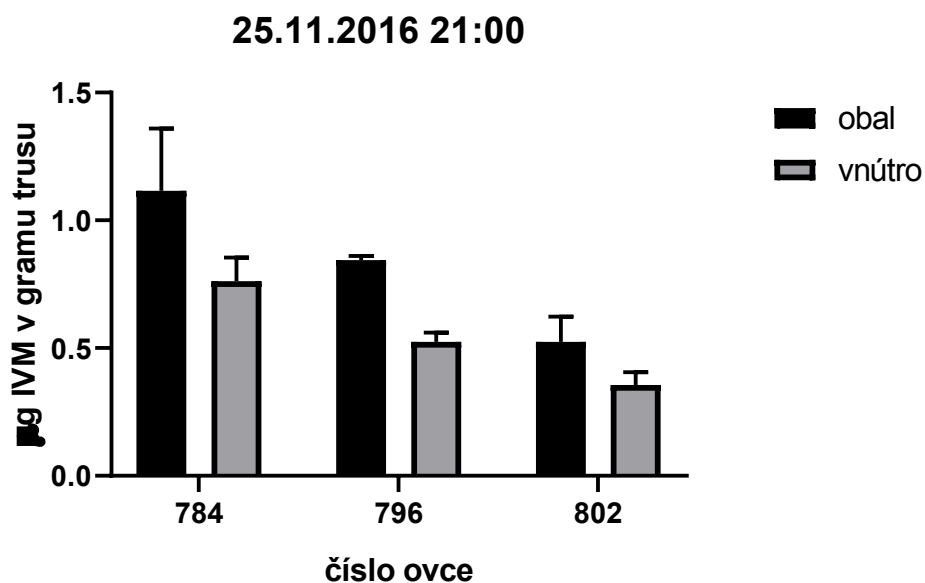
Dátum odberu 23.11.2016 21:00 v čase 36h od podania liečiva. V Tab 2. sú uvedené jednotlivé hmotnosti vzoriek. Jednotlivé ovce boli vybrané na základe maximálnych koncentrácií, ktoré sú uvedené v kapitole 5.1.1.

Štatistická analýza: 2way ANOVA s následným Sidakovým testom. Výsledky sú vyjadrené ako priemery \pm SD. Hodnota významnosti: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.



Obrázok 11. Porovnanie koncentrácií obalu a vnútra trusu u vybraných oviec. Dátum odberu 23.11.2016 21:00 v čase 36h od podania liečiva. V Tab 3. sú uvedené jednotlivé hmotnosti vzoriek. Jednotlivé ovce boli vybrané na základe maximálnych koncentrácií, ktoré sú uvedené v kapitole 5.1.1. a výsledkov, ktoré sú uvedené na Obrázku 10.

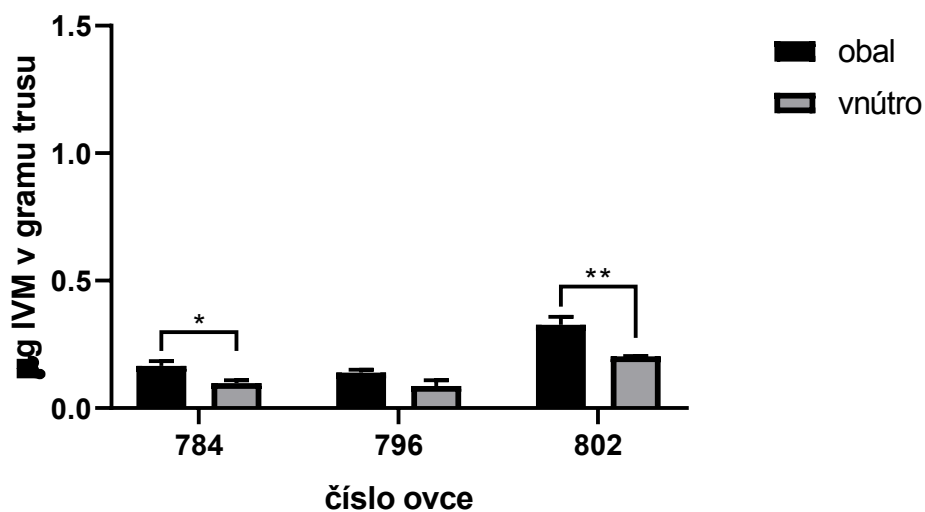
Štatistická analýza: 2way ANOVA s následným Sidakovým testom. Výsledky sú vyjadrené ako priemery \pm SD. Hodnota významnosti: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.



Obrázok 12. Porovnanie koncentrácií obalu a vnútra trusu u vybraných oviec. Dátum odberu 25.11.2016 21:00 v čase 84h od podania liečiva. V Tab 4. sú uvedené jednotlivé hmotnosti vzoriek. Jednotlivé ovce boli vybrané na základe maximálnych koncentrácií, ktoré sú uvedené v kapitole 5.1.1. a výsledkov, ktoré sú uvedené na Obrázku 10.

Štatistická analýza: 2way ANOVA s následným Sidakovým testom. Výsledky sú vyjadrené ako priemery \pm SD. Hodnota významnosti: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

30.11.2016 9:00



Obrázok 13. Porovnanie koncentrácií obalu a vnútra trusu u vybraných oviec. Dátum odberu 30.11.2016 9:00 v čase 192h od podania liečiva. V Tab 5. sú uvedené jednotlivé hmotnosti vzoriek. Jednotlivé ovce boli vybrané na základe maximálnych koncentrácií, ktoré sú uvedené v kapitole 5.1.1. a výsledkov, ktoré sú uvedené na Obrázku 10.

Štatistická analýza: 2way ANOVA s následným Sidakovým testom. Výsledky sú vyjadrené ako priemery \pm SD. Hodnota významnosti: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

6 Diskusia

Farmakologická účinnosť je úzko spojená s farmakokinetickými vlastnosťami liečiv. Z toho vyplýva, že racionálne užívanie liečiv je založené na znalosti základných farmakokinetických faktorov u cieľového druhu, čo následne napomáha optimalizovať klinickú účinnosť (González Canga et al., 2009).

Ako sme predpokladali pred samotným podaním jednotlivej dávky ivermektínu nebol v truse oviec detegovaný ivermektín. Prvý detekovateľný ivermektín sme zaznamenali až 8 hodín po podaní a ostal detekovateľný 13-17 dní po podaní. Farmakokinetické parametre, ktoré sme sledovali boli čas nutný pre dosiahnutie maximálnej koncentrácie (t_{\max}), maximálna koncentrácia truse (c_{\max}), plocha pod krivkou (AUC) a priemerný rezidenčný čas (MRT). Jednotlivé namerané hodnoty sú uvedené v Tab 6.

Vylučovanie ivermektínu trusom u po podaní jednotlivej dávky 0,2 mg/kg živej hmotnosti u dobytka skúmal aj Fernandez et al. (2009). V porovnaní s našimi výsledkami dosahoval dobytok o niečo nižšie hodnoty maximálnej koncentrácie (0,87 $\mu\text{g/g}$). Taktiež čas nutný pre dosiahnutie maximálnej koncentrácie ($t_{\max}=134,4 \pm 82,56$ h) a priemerný rezidenčný čas (MRT=205,68 \pm 51,36) dosahovali vyššie hodnoty čo naznačuje, že ivermektín je rýchlejšie vylučovaný u oviec než u dobytka.

Štúdie vylučovania ivermektínu boli realizované aj u iných zvieracích druhov. Po perorálnom podaní ivermektínu v dávke 0,2 mg/kg živej hmotnosti u koní dosahovala maximálna koncentrácia hodnotu 10,99 \pm 12,45 $\mu\text{g/g}$. Tieto vysoké hodnoty môžu byť spôsobené neprítomnosťou bachora kde by dochádzalo k degradácii ivermektínu a zároveň vysokou aktivitou P-glykoproteínu v tenkom čreve. Vysoké rozdiely sú aj v t_{\max} (5,5 h) a MRT (28 h) čo naznačuje rýchlejšie vylučovanie než u oviec (Gokbulut et al., 2016). U somárov po perorálnom podaní 0,2 mg/kg živej hmotnosti dosahovala maximálna koncentrácia hodnôt 9,33 $\mu\text{g/g}$. Čas nutný pre dosiahnutie maximálnej koncentrácie ($t_{\max}=55,9$ h) dosahoval vyšších hodnôt a zároveň MRT dosahoval hodnôt nižších (64,3 h) (Gokbulut et al., 2005). Avšak tieto štúdie boli vykonané po perorálnom podaní na rozdiel od subkutánneho, preto nemôžeme tieto výsledky jednoznačne porovnávať.

Vplyvom toho, že ivermektín je veľmi lipofilná molekula je charakteristický veľkým distribučným objemom a pretrvávaním najmä v tukovom tkanive po veľmi dlhú

dobu, rádovo až v týždňoch. Zároveň farmakokinetika ivermektínu je charakterizovaná veľkými intraindividuálnymi aj interindividuálnymi rozdielmi (Cerkvenik et al., 2002).

Veľké interindividuálne rozdiely v eliminácii ivermektínu sme pozorovali aj v našej štúdii. Rozdiely boli charakterizované najmä v nameraných hodnotách c_{max} , ktoré sme namerali v truse jednotlivých oviec. Najnižšia dosiahnutá maximálna koncentrácia v truse bola 0,39 $\mu\text{g/g}$, zatiaľ čo najvyššia nameraná maximálna koncentrácia bola 1,55 $\mu\text{g/g}$ čo je približne 4 krát vyššia hodnota.

Našou snahou bolo taktiež eliminovať faktory, ktoré by mohli viesť k rozdielnej koncentrácii ivermektínu v truse. Všetky baránky boli rovnakého druhu, boli chované v rovnakých podmienkach a dostávali rovnakú stravu. Taktiež všetkým sme aplikovali rovnakú dávku ivermektínu (0,2 mg/kg živej hmotnosti) s rovnakou cestou podania (subkutánne). Predpokladáme, že interindividuálne rozdiely v eliminácii ivermektínu sú založené najmä na interindividuálnych rozdieloch príjmu potravy a tvorbe trusu. Taktiež zmeny v úrovniach pohlavných hormónov a rozdieloch v enzýmoch, ktoré metabolizujú liečivo mohli mať vplyv na výsledky hodnôt farmakokinetických parametrov. Tieto interindividuálne rozdiely v metabolizme ivermektínu pravdepodobne prispievajú k jeho rozdielnym hodnotám v truse jednotlivých barančekov.

Pri vyhodnocovaní eliminačných profilov jednotlivých barančekov sme mohli pozorovať špecifický profil vylučovania. Koncentrácia ivermektínu dosahovala maximálnych hodnôt krátko po podaní. Následne mierne klesá, po tomto poklese nasleduje ďalší pík, obvykle menší než ten prvý. Po píku nasleduje postupná nelineárna exkrécia ivermektínu. Aj napriek tomuto špecifickému modelu je možné pozorovať výrazne interindividuálne rozdiely vo farmakokinetike.

Rýchly nárast koncentráci ivermektínu by mohol byť vysvetlený prítomnosťou efluxného transportéru P-glykoproteínu v tenkom čreve. Ivermektín je známym substrátom P-glykoproteínu a po subkutánnom podaní čiastočne obchádza pečeň a je vylučovaný priamo pomocou P-glykoproteínu. Najvyššia koncentrácia bola zistená v ileu tenkého čreva, z čoho predpokladáme, že práve tam z väčšej časti prebieha eliminácia (Ballent et al., 2013). Preto predpokladáme, že prvý pík by mohol byť spôsobený rýchlou a priamou elimináciou ivermektínu pomocou P-glykoproteínu v enterocytoch. Druhý pík, ktorý sme pozorovali deň po prvom, by mohol byť vysvetlený elimináciou ivermektínu pomocou žlči. Z tohto poznatku môžeme vyvodiť,

že prechod ivermektínu z krvného riečiska do trusu pomocou P-glykoproteínu je rýchlejší než prechod do trusu cez pečeň a žľ.

V štúdiu kde sme sledovali koncentrácie ivermektínu vo vonkajšej časti trusu a vo vnútri trusu sme zaznamenali, že koncentrácia ivermektínu bola vždy vyššia v obalovej vrstve trusu u všetkých sledovaných oviec. Jednotlivé ovce pre túto štúdiu boli vybrané na základe získaných hodnôt maximálnych koncentrácií v predchádzajúcej analýze. Vyššia koncentrácia na povrchu bola pravdepodobne zapríčinená tým, že ivermektín sa koncentruje na povrchu trusu pri jeho tvorbe. Predpokladáme, že je to spôsobené prítomnosťou P-glykoproteínu, ktorý vylučuje ivermektín priamo do čreva.

7 Záver

V tejto práci sa nám podarilo určiť exkrečný profil ivermektínu po jednorázovom subkutánnom podaní šiestim barančekom. Stanovili sme základné farmakokinetické parametre, medzi ktoré patrí koncentrácia ivermektínu v truse (c_{\max} - $0,93 \pm 0,50 \mu\text{g.g}^{-1}$), čas nutný pre dosiahnutie maximálnej koncentrácie (t_{\max} - $46,8 \pm 13,63 \text{ h}$), plochu pod krivkou (AUC - $101,91 \pm 28,44 \mu\text{g.h.g}^{-1}$) a priemerný rezidenčný čas (MRT - $122,26 \pm 25,13 \text{ h}$). Pozorovali sme značné interindividuálne rozdiely vo farmakokinetike ivermektínu, ktoré boli pravdepodobne spôsobené fyziologickými odlišnosťami jednotlivých oviec. Aj napriek tejto skutočnosti sme pozorovali špecifický profil vylučovania ivermektínu, ktorý bol zhodný u všetkých sledovaných oviec. Z analýzy, kde sme skúmali povrch a vnútro trusu sme zistili, že vyššia koncentrácia ivermektínu sa vždy nachádzala v obalovej vrstve trusu.

Z výsledkov vyplýva, že ivermektín sa vylučuje ešte po niekoľko týždňov od podania, preto by jedince, ktoré sú ním liečené nemali byť držané na pasienkoch aby sa predišlo poškodeniu životného prostredia.

8 Zdroje

Albert Lo, P. K., Fink, D. W., Williams, J. B., & Blodinger, J. (1985). Pharmacokinetic studies of ivermectin: Effects of formulation. *Veterinary Research Communications*, 9(1), 251–268. <http://doi.org/10.1007/BF02215150>

Ballent, M., Wilkens, M. R., Maté, L., Muscher, A. S., Virkel, G., Sallovitz, J., ... Lifschitz, A. (2013). P-glycoprotein in sheep liver and small intestine: Gene expression and transport efflux activity. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 36(6), 576–582. <https://doi.org/10.1111/jvp.12040>

Bassissi, M. F., Alvinerie, M., & Lespine, A. (2004). Macrocyclic lactones: Distribution in plasma lipoproteins of several animal species including humans. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 138(4), 437–444. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2004.07.011>

Besier, R. B., Kahn, L. P., Sargison, N. D., & Van Wyk, J. A. (2016). *Diagnosis, Treatment and Management of Haemonchus contortus in Small Ruminants*. *Advances in Parasitology* (Vol. 93). Elsevier Ltd. <http://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.02.024>

Campbell, W. C. (1993). Ivermectin, an antiparasitic agent. *Medicinal Research Reviews*, 13(1), 61–79. <http://doi.org/10.1002/med.2610130103>

Campbell, William C., 1989. *Ivermectin and Abamectin* [online]. 1. vyd. B.m.: 60Springer-Verlag New York. ISBN 978-1-4612-3626-9. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4612-3626-9

Cerkvenik, V., Grabnar, I., Skubic, V., Doganoc, D. Z., Beek, W. M. J., Keukens, H. J., ... Pogačnik, M. (2002). Ivermectin pharmacokinetics in lactating sheep. *Veterinary Parasitology*, 104(2), 175–185. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00612-4](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00612-4)

Coskun O. (2016). Separation techniques: Chromatography. *Northern clinics of Istanbul*, 3(2), 156–160. doi:10.14744/nci.2016.32757

Craven, J., Hennessy, D. R., & Friis, C. (2002). Does the rate of fat deposition influence the pharmacokinetic disposition of subcutaneously administered moxidectin and ivermectin in pigs? *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 25(5), 351–357. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2885.2002.00435.x>

Danaher, M., Howells, L. C., Crooks, S. R. H., Cerkenik-Flajs, V., & O’Keeffe, M. (2006). Review of methodology for the determination of macrocyclic lactone residues in biological matrices. *Journal of Chromatography B*, 844(2), 175–203. doi:10.1016/j.jchromb.2006.07.035

Danaher, M., Howells, L. C., Crooks, S. R. H., Cerkenik-Flajs, V., & O’Keeffe, M. (2006). Review of methodology for the determination of macrocyclic lactone residues in biological matrices. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 844(2), 175–203. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.07.035>

Daurio, C. P., Cheung, E. N., Jeffcoat, A. R., & Skelly, B. J. (1992). Bioavailability of ivermectin administered orally to dogs. *Veterinary Research Communications*, 16(2), 125–130. <https://doi.org/10.1007/BF01839009>

De Hoffmann, E., Stroobant, V., 2007. Mass Spectrometry, Principles and Applications, Third Edition, John Wiley & Sons Ltd, England. ISBN: 978-0-470-03310-4

Denbow, R. M. a D. M. Akers, 2013. *Anatomy and Physiology of Domestic Animals* [online]. 2. vyd. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell. ISBN 978-1-118-35638-8. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4419-9653-4

Dostálek, Miroslav, Eva Janoštková, Jan Juřica a Lucie Zahradníková, 2006. *Farmakokinetika*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing. ISBN 80-247-1464-7.

Emery, D. L., Hunt, P. W., & Le Jambre, L. F. (2016). Haemonchus contortus: the then and now, and where to from here? *International Journal for Parasitology*, 46(12), 755–769. <http://doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.07.001>

Fernandez, C., Andrés, M. S., Porce, M. A., Rodriguez, C., Alonso, A., & Tarazona, J. V. (2009). Pharmacokinetic profile of Ivermectin in cattle dung excretion,

and its associated environmental hazard. *Soil and Sediment Contamination*, 18(5), 564–575. <https://doi.org/10.1080/15320380903085675>

Friedecký, David a K. Lemr, 2012. Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klinická Biochemie a Metabolismus*. 20(41), 152–157. ISSN 12107921.

Garrido Frenich, A., Aguilera-Luiz, M. del M., Martínez Vidal, J. L., & Romero-González, R. (2010). Comparison of several extraction techniques for multiclass analysis of veterinary drugs in eggs using ultra-high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 661(2), 150–160. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.12.016>

Gill, J. H., & Lacey, E. (1998). Avermectin/milbemycin resistance in trichostrongyloid nematodes. *International Journal for Parasitology*, 28(6), 863–877. [http://doi.org/10.1016/S0020-7519\(98\)00068-X](http://doi.org/10.1016/S0020-7519(98)00068-X)

Gokbulut, C., Boyacioglu, M., & Karademir, U. (2005). Plasma pharmacokinetics and faecal excretion of ivermectin (Eqvalan® paste) and doramectin (Dectomax®, 1%) following oral administration in donkeys. *Research in Veterinary Science*, 79(3), 233–238. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2005.01.002>

Gokbulut, C., Ozuicli, M., Aksit, D., Aksoz, E., Korkut, O., Yalcinkaya, M., & Cirak, V. Y. (2016). Comparative plasma and milk dispositions, faecal excretion and efficacy of per os ivermectin and pour-on eprinomectin in horses. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 39(6), 584–591. <https://doi.org/10.1111/jvp.12308>

González Canga, A., Sahagún Prieto, A. M., José Díez Liébana, M., Martínez, N. F., Vega, M. S., & Vieitez, J. J. G. (2009). The pharmacokinetics and metabolism of ivermectin in domestic animal species. *Veterinary Journal*, 179(1), 25–37. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.07.011>

Hartfoot, C. G. (1981). Anatomy, physiology and microbiology of the ruminant digestive tract A2 – Christie, William W. BT - *Lipid Metabolism in Ruminant Animals*. Lipid metabolism in ruminant animals. Pergamon Press Ltd. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-023789-3.50005-2>

Chen, S., & Kord, A. (2013). UHPLC Method Development. Ultra-High Performance Liquid Chromatography and Its Applications, 1–30. doi:10.1002/9781118533956.ch1

Chiu, S. H. L., Green, M. L., Baylis, F. P., Eline, D., Rosegay, A., Meriwether, H., & Jacob, T. A. (1990). Absorption, Tissue Distribution, and Excretion of Tritium-Labeled Ivermectin in Cattle, Sheep, and Rat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(11), 2072–2078. <https://doi.org/10.1021/jf00101a015>

Jelínek, Pavel a Karel Koudela. *Fyziologie hospodářských zvířat*. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2003. ISBN 80-7157-644-1.

Klimeš, Jiří, Jaroslav Sochor, Milan Mokřý a Petr Kastner, 2011. *Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami*. 1. vyd. Hradec Králové: Nucleus HK. ISBN 978-80-87009-29-1.

Kotze, A. C., & Prichard, R. K. (2016). *Anthelmintic Resistance in Haemonchus contortus. History, Mechanisms and Diagnosis. Advances in Parasitology* (Vol. 93). Elsevier Ltd. <http://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.02.012>

Lamka, J. a Ducháček, L. (2014) Veterinární léčiva pro posluchače farmacie. Vyd. 4., nezměn. Praha: Karolinum, 2014. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 978-80-246-2790-8.

M. Xu, M. Molento, W. Blackhall, P. Ribeiro, R. Beech, R. Prichard Ivermectin resistance in nematodes may be caused by alteration of P-glycoprotein homolog Mol. Biochem. Parasitol., 91 (2) (1998), pp. 327-335

Marriner, S. E., McKinnon, I., & Bogan, J. A. (1987). The pharmacokinetics of ivermectin after oral and subcutaneous administration to sheep and horses. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 10(2), 175–179. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2885.1987.tb00097.x>

McMaster, Marvin C., 2005. *LC/MS A PRACTICAL USER'S GUIDE*. ISBN 978-0-471-65531-2.

Molento, M. B., Lifschitz, A., Sallovitz, J., Lanusse, C., & Prichard, R. (2004). Influence of verapamil on the pharmacokinetics of the antiparasitic drugs ivermectin

and moxidectin in sheep. *Parasitology Research*, 92(2), 121–127.
<https://doi.org/10.1007/s00436-003-1022-3>

Peter, J. W., & Chandrawathani, P. (2005). Haemonchus contortus: parasite problem No. 1 from tropics - Polar Circle. Problems and prospects for control based on epidemiology. *Tropical Biomedicine*, 22(2), 131–7. Retrieved from
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16883278>

Regnier, F. E. (1983). High-performance liquid chromatography of biopolymers. *Science*, 222(4621), 245 LP-252. <https://doi.org/10.1126/science.6353575>

REW, Robert S. a Jozef VERCRUYSE, 2002. Macrocyclic lactones in antiparasitic therapy[online]. ISBN0851996175. Dostupné z:
[doi:10.1079/9780851996172.0000](https://doi.org/10.1079/9780851996172.0000)

Scott, E. W., & McKellar, Q. A. (1992). The distribution and some pharmacokinetic parameters of ivermectin in pigs. *Veterinary Research Communications*, 16(2), 139–146. <https://doi.org/10.1007/BF01839011>

Scott, E. W., Kinabo, L. D., & McKellar, Q. A. (1990). Pharmacokinetics of ivermectin after oral or percutaneous administration to adult milking goats. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 13(4), 432–435.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.1990.tb00800.x>

Shoop, W. L., Mrozik, H., & Fisher, M. H. (1995). Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health. *Veterinary Parasitology*, 59(2), 139–156. [http://doi.org/10.1016/0304-4017\(94\)00743-V](http://doi.org/10.1016/0304-4017(94)00743-V)

Sláma, P., Pavlík, A., Tančín, V., 2015. Morfologie a fyziologie hospodářských zvířat. Mendelova univerzita v Brně. Dostupné z
:https://web2.mendelu.cz/af_291_projekty/files/23/23-morfologie_a_fyziologie_hospodarskyh_zvirat_word_2010.pdf

Steel, J. W. (1993). Pharmacokinetics and metabolism of avermectins in livestock. *Veterinary Parasitology*, 48(1–4), 45–57. [http://doi.org/10.1016/0304-4017\(93\)90143-B](http://doi.org/10.1016/0304-4017(93)90143-B)

Swartz, M. E. (2005). *UPLC™: An Introduction and Review. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 28(7-8), 1253–1263. doi:10.1081/jlc-200053046

Tway, P. C., Dddowning, G. V., Slayback, J. R. B., Rahn, G. S., & Isersee, R. K. (1984). Conffirmatory assay for ivermectin in cattle tissue using chemical ionization mass spectrometry/mass spectrometry (MS/MS). *Biological Mass Spectrometry*, 11(4), 172–176. <https://doi.org/10.1002/bms.1200110407>

Tway, P. C., Wood, J. S., & Downing, G. V. (1981). Determination of Ivermectin in Cattle and Sheep Tissues Using High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 29(5), 1059–1063. <https://doi.org/10.1021/jf00107a041>

ÚSKVBL₁ [Internet]. Souhrn údajů o přípravku veterinárních léčivých přípravků –farmaceutik: IVOMEC 1% injekční roztok <http://www.uskvbl.cz/attachments/spc/0910f7c780095114.doc>

ÚSKVBL₂ [Internet]. Souhrn údajů o přípravku veterinárních léčivých přípravků –farmaceutik: Advocate pro kočky a fretky, Advocate pro psy <http://uskvbl.cz/attachments/spc/0910f7c7800f2f2e.pdf>

Vokřál, I., Jedličková, V., Jirásko, R., Stuchlíková, L., Bártíková, H., Skálová, L., ... Szotáková, B. (2013). The metabolic fate of ivermectin in host (*Ovis aries*) and parasite (*Haemonchus contortus*). *Parasitology*, 140(3), 361–367. <https://doi.org/10.1017/S0031182012001680>

Volf, P., Horák, p. a kol. (2007). *Paraziti a jejich biologie*. Triton, 318 s. Praha. ISBN 978-80-7387-008-9

Wolstenholme, A. J., & Rogers, A. T. (2005). Glutamate-gated chloride channels and the mode of action of the avermectin/milbemycin anthelmintics. *Parasitology*, 131(SUPPL. 1). <http://doi.org/10.1017/S0031182005008218>

Wolstenholme, A. J., Fairweather, I., Prichard, R., Von Samson-Himmelstjerna, G., & Sangster, N. C. (2004). Drug resistance in veterinary helminths. *Trends in Parasitology*, 20(10), 469–476. <http://doi.org/10.1016/j.pt.2004.07.010>

Xiao, H., Peng, H., Zhao, T., kong, J., Xue, J., Wang, J., ... Cao, X. (2019). The pharmacokinetics of moxidectin following intravenous and topical administration to swine. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 42(1), 111–115. <http://doi.org/10.1111/jvp.12693>

Zhang, Y., Huo, M., Zhou, J., & Xie, S. (2010). PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 99(3), 306–314. <https://doi.org/10.1016/j.cmpb.2010.01.007>